

Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Bioquímica

## Evolución del blastocisto del ratón. Mecanismos de especificación de los primeros linajes.

Miguel Crespo Alonso

Madrid, 2008





Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

## Evolución del blastocisto del ratón. Mecanismos de especificación de los primeros linajes.

Miguel Crespo Alonso. Licenciado en Ciencias Biológicas.

Director de la tesis: Miguel Manzanares Fourcade

Madrid



Miguel Manzanares Fourcade, Investigador Senior del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC),

CERTIFICA

que Miguel Crespo Alonso, Licenciado en Biología, ha realizado bajo mi dirección, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) de Madrid, y en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), el trabajo titulado “Evolución del blastocisto del ratón. Mecanismos de especificación de los primeros linajes”. El presente trabajo cumple con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como tesis doctoral.

Madrid, 14 de Mayo de 2008.

Miguel Manzanares  
Department of Cardiovascular Developmental Biology  
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares-CNIC  
Melchor Fernandez Almagro, 3  
28029 Madrid, Spain



A mis padres





*In the beginning of years, when the world was so new and all, and the Animals were just beginning to work for Man, there was a Camel, and he lived in the middle of a Howling Desert because he did not want to work; and besides, he was a Howler himself. So he ate sticks and thorns and tamarisks and milkweed and prickles, most 'scruciating idle; and when anybody spoke to him he said 'Humph!' Just 'Humph!' and no more.*

How the camel got his hump.

Just So Stories.

Rudyard Kipling

*Voici mon secret. Il est très simple: on ne voit bien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible pour les yeux.*

Le Petit Prince.

Antoine de Saint-Exupéry.



# 1 Resumen



El blastocisto del ratón aparece como una novedad evolutiva en el linaje de los mamíferos, ya que en el resto de los vertebrados no se conoce una estructura similar. Al contrario de otros animales, como los peces, los anfibios o las aves, el embrión temprano del ratón no se asienta sobre la yema y esta circunstancia hace que las primeras fases de su desarrollo sean muy diferentes a otros vertebrados. Por ello, es clave conocer los mecanismos que controlan el origen de los linajes que componen el blastocisto. Durante las primeras divisiones, el oocito fertilizado del ratón sufre varios ciclos de divisiones mitóticas en las que se produce un número creciente de células indiferenciadas. En un momento determinado, ocurre una primera diferenciación morfológica que da lugar a los dos primeros linajes que componen el blastocisto: el trofoectodermo y la masa celular interna. El primer gen conocido cuya expresión se restringe al trofoectodermo es *Cdx2*.

En este trabajo intentamos responder por una parte a la pregunta de en qué momento quedan determinadas las células tempranas del embrión para dar lugar a uno u otro linaje. Para ello llevamos a cabo un estudio de trazado genético en el que marcamos uno de los blastómeros que componen el embrión de dos o cuatro células, con el que pretendíamos saber si su descendencia hace alguna contribución específica al blastocisto. Como resultado obtuvimos que estos blastómeros tempranos no están restringidos en su potencial, por lo que pueden dar lugar a cualquiera de los componentes del blastocisto.

Por otra parte, nos preguntamos qué cambios han tenido lugar en la evolución de los vertebrados para que la aparición del blastocisto sea posible y se dé esta decisión de linaje en un momento concreto del desarrollo del ratón. Partiendo de la hipótesis de que es probable que los cambios hayan ocurrido en los mecanismos de regulación de la expresión genética, estudiamos el patrón de expresión del gen *Cdx2* en el pollo para compararlo con el que presenta en el blastocisto. Observamos que *Cdx2* se expresa en el embrión temprano del pollo siguiendo un patrón que recuerda al del blastocisto del ratón, al estar restringido a la región extraembrionaria, aunque no podemos atribuir un origen evolutivo común a ambas estructuras. Además, hicimos un estudio comparado de la región genómica de *Cdx2* en busca de elementos reguladores responsables de esta nueva función que *Cdx2* lleva a cabo en el embrión del ratón. Este estudio dio como resultado la localización de varios elementos reguladores, entre los que destaca uno que dirige la expresión de *Cdx2* de forma restringida al trofoectodermo, y que notablemente solo está presente en mamíferos euterios.

De acuerdo con nuestros resultados, podemos afirmar que los blastómeros que componen el embrión del ratón en los estadios de dos y cuatro células no están aún determinados, por lo que esta decisión debe de ocurrir más tarde. Por último, la co-opción de *Cdx2* para intervenir en la especificación de los blastómeros tempranos hacia el fenotipo de trofoectodermo, así como los cambios que han tenido lugar en su regulación a lo largo de la evolución, pueden haber contribuido a la aparición del blastocisto en el linaje de los mamíferos.



## Abstract





The mouse blastocyst emerges as an evolutionary novelty in the mammalian lineage, since no similar structure is known in other vertebrates. Contrary to other animals, like fishes, amphibians or birds, the early mouse embryo does not rely on yolk for nutrition, which makes the first steps of its development very different from other vertebrates. Therefore, understanding the mechanisms that control the appearance of the lineages that make up the blastocyst is crucial. During the first cleavages, the fertilized mouse oocyte undergoes several mitotic divisions that increase the number of undifferentiated cells. At a specific point, the first morphological differentiation takes place, by which the first two lineages that make up the blastocyst are generated: the trophoblast and the inner cell mass. The first known gene whose expression becomes restricted to the trophoblast is *Cdx2*.

In the present study, we try to answer the question of which is the moment when cells become determined to give rise to one or the other lineage. To that end, we have carried out a genetic tracing study in which we mark one of the blastomeres that make up the two- or four-cell embryo, aimed at knowing whether its descendants specifically contribute to any part of the blastocyst. As a result we found that early blastomeres do not have a restricted potential and are, hence, capable of giving rise to any of the blastocyst lineages.

On the other hand, we asked ourselves what changes have made possible the appearance of the blastocyst and this particular lineage decision in the evolution of vertebrates. Starting from the hypothesis that these changes probably took place in the regulation of gene expression, we studied the expression pattern of *Cdx2* in the chicken embryo and compared it to that of the mouse blastocyst. We observed that *Cdx2* expression pattern in the early chicken embryo is reminiscent of that of the blastocyst, in so far as it is restricted to the extraembryonic region, although no common evolutionary origin can be ascertained. Furthermore, we carried out a comparative study of the genomic region of *Cdx2* in search of regulatory elements responsible for this novel function of *Cdx2* in the mouse embryo. This approach yielded a number of regulatory elements, among which one of them is worth mentioning for its ability to drive restricted gene expression to the trophoblast, and which is only present in eutherian mammals.

According to these results, it can be stated that two- and four-cell embryo blastomeres are not yet determined, so this decision must be made later on. On the other hand, *Cdx2* co-option to take part in early blastomere specification towards the trophoblast phenotype, together with the regulation changes that have taken place along evolution, might have contributed to the occurrence of the blastocyst in the mammalian lineage.



# Índice

1. Resumen.....	1
2. Abreviaturas.....	11
3. Introducción. ....	15
3.1 El desarrollo temprano del embrión del ratón.....	18
3.1.1 El embrión del ratón: el huevo sin yema.....	18
3.1.2 Primeras divisiones.....	18
3.1.3 La mórula.....	20
3.1.4 El blastocisto.....	21
3.1.5 Especificación de los primeros ejes y linajes.....	21
3.1.6 La eclosión.....	22
3.2 ¿Cuándo se determinan los linajes que componen el blastocisto del ratón?.....	23
3.2.1 ¿Cuándo surgen las diferencias entre los blastómeros que componen el embrión?.....	24
3.2.2 La orientación del eje de la primera división mitótica.....	25
3.3 Control genético de la especificación de los primeros linajes del blastocisto del ratón.....	26
3.3.1 La especificación de la masa celular interna.....	26
3.3.2 La especificación del trofoectodermo: <i>Cdx2</i> .....	27
3.4 Origen evolutivo de <i>Cdx2</i> .....	30
3.5 Comparación del desarrollo pre-gastrulación de mamíferos con otros vertebrados. El embrión del pollo.....	32
3.5.1 Primeras divisiones.....	33
3.5.2 Especificación de los ejes corporales y gastrulación.....	34
3.5.3 ¿Nos ayuda el pollo a conocer la evolución del blastocisto?.....	35
4. Objetivos.....	37

5. Materiales y métodos.....	41
5.1 Cepas de ratón.....	43
5.2 Análisis de secuencias.....	43
5.3 Generación de construcciones.....	44
5.4 Obtención y cultivo de los embriones de ratón.....	45
5.5 Administración del tamoxifeno.....	46
5.6 Generación y análisis de embriones transgénicos de ratón.....	46
5.7 Detección de la actividad $\beta$ -galactosidasa.....	47
5.8 Hibridación <i>in situ</i> en embriones de pollo.....	47
5.9 Visualización de embriones y procesamiento de imágenes.....	48
6. Resultados.....	49
6.1. Estudios de trazado genético de linaje en el embrión de ratón en estadios de preimplantación.....	51
6.1.1 Puesta a punto del sistema de trazado de linaje.....	51
6.1.2 Ensayos de marcaje de los blastómeros tempranos para conocer su descendencia.....	54
6.1.3 Administración de tamoxifeno en estadio de cuatro células.....	59
6.2. Mecanismos genéticos que subyacen a las primeras decisiones de linaje del embrión: la regulación y la expresión de <i>Cdx2</i> .....	61
6.2.1 Expresión de <i>Cdx2</i> en el embrión temprano del pollo.....	61
6.2.2 Genómica comparada de <i>Cdx2</i> en vertebrados.....	63
6.2.3 Ensayos de actividad reguladora en blastocistos de ratón.....	67
7. Discusión.....	73
7.1 ¿En qué momento se determinan los linajes que formarán el blastocisto?.....	76
7.2 ¿De dónde viene el blastocisto del ratón?.....	80
7.3 Linajes, morfología y redes génicas: ¿huevo o gallina?.....	83
8. Conclusiones.....	87
9. Bibliografía.....	91

## 2 Abreviaturas



ICM.....	Masa celular interna
TE.....	Trofoectodermo
PE.....	Endodermo Primitivo
EPI.....	Epiblasto
EPC.....	Cono ectoplacentario
ExE.....	Ectodermo
extraembrionario	
Embr.....	Porción embrionaria
Extr.....	Porción Extraembrionaria
AO.....	Área opaca
AP.....	Área pelúcida
LP.....	Línea primitiva
V.....	Ventral
D.....	Dorsal
Ant.....	Anterior
Post.....	Posterior
Kpbs.....	Kilo pares de bases
ED.....	<i>Enhancer</i> distal
EP.....	<i>Enhancer</i> proximal
PP.....	Promotor proximal
EGK .....	Tabla normal del desarrollo temprano del pollo de Eyal-Giladi y Kochav.
HH .....	Tabla normal del desarrollo del pollo de Hamburger y Hamilton.





## 3 Introducción



Hace ya mucho tiempo que los estudiosos de la evolución observaron que los cambios en la morfología corporal de los animales se deben a cambios que tienen lugar durante el desarrollo embrionario. De la misma manera, los biólogos del desarrollo comenzaron a hacer estudios comparados para conocer las relaciones entre grupos diferentes y así saber la relación entre el desarrollo de diferentes especies. Entre los resultados más sorprendentes y, probablemente, más contraintuitivos de la investigación en biología evolutiva del desarrollo se encuentra el hecho de que la diversidad de los planes corporales y de la morfología de los organismos a lo largo de muchos filos no aparecen necesariamente reflejados en una diversidad de los genes implicados en el desarrollo. Por el contrario, estos genes son frecuentemente muy similares entre animales muy alejados evolutivamente. Por ello, el paradigma actual postula que el uso diferencial de estos genes por parte de las diferentes especies les llevaría a resultados muy divergentes, aún partiendo de elementos compartidos. Esto equivale a decir que el conocimiento de los cambios que tienen lugar durante el desarrollo es el que nos permitirá saber cómo se generan morfologías tan divergentes, ya que es en este momento cuando se establece el diseño corporal del animal.

En las etapas tempranas del desarrollo las diferentes especies presentan rasgos distintivos, como son por ejemplo la variedad de tipos de gastrulación que observamos entre animales como los peces y los mamíferos. De la misma manera, las últimas etapas del desarrollo diferencian a unas especies de otras, y es menos frecuente encontrar puntos en común en el desarrollo de vertebrados poco próximos, como pueden ser los mamíferos y los peces.

Sin embargo, todos los vertebrados pasan por un punto a lo largo de su desarrollo en el que son similares morfológicamente, aunque en etapas tempranas y más adelante acaban por divergir. Todos alcanzan un estadio en el que se ha especificado su eje anteroposterior, se ha formado un cordón nervioso, ha comenzado la segmentación y se han ubicado los primordios de las extremidades. Este momento se conoce como estadio filotípico y se cree que representa el plan corporal básico común a todos los vertebrados. Además, el estadio filotípico está controlado por los genes *Hox* (Slack et al., 1993).

A pesar de sus evidentes diferencias en el estado adulto, todos los vertebrados comparten un esquema elemental en su organización. Este plan es reconocible en todos ellos y viene definido por la especificación de los ejes y la simetría izquierda derecha, así como la cabeza en la parte más anterior con una especial concentración de los órganos sensoriales, seguida de las extremidades y en la parte más posterior, la cola.

El objetivo de este trabajo es entender cómo se produce la variación en las primeras fases del desarrollo, que son clave en el establecimiento del diseño corporal. En concreto, nos hemos centrado en el desarrollo del blastocisto y el fenómeno de la aparición del trofoectodermo en el linaje de los mamíferos, como novedad evolutiva. Este linaje aparece por primera vez en la evolución en los mamíferos y contribuirá a su vez al desarrollo de una estructura totalmente nueva, la placenta invasiva, que no se da en ningún otro grupo.

### **3.1 El desarrollo temprano del embrión del ratón:**

#### **3.1.1 El embrión del ratón: el huevo sin yema.**

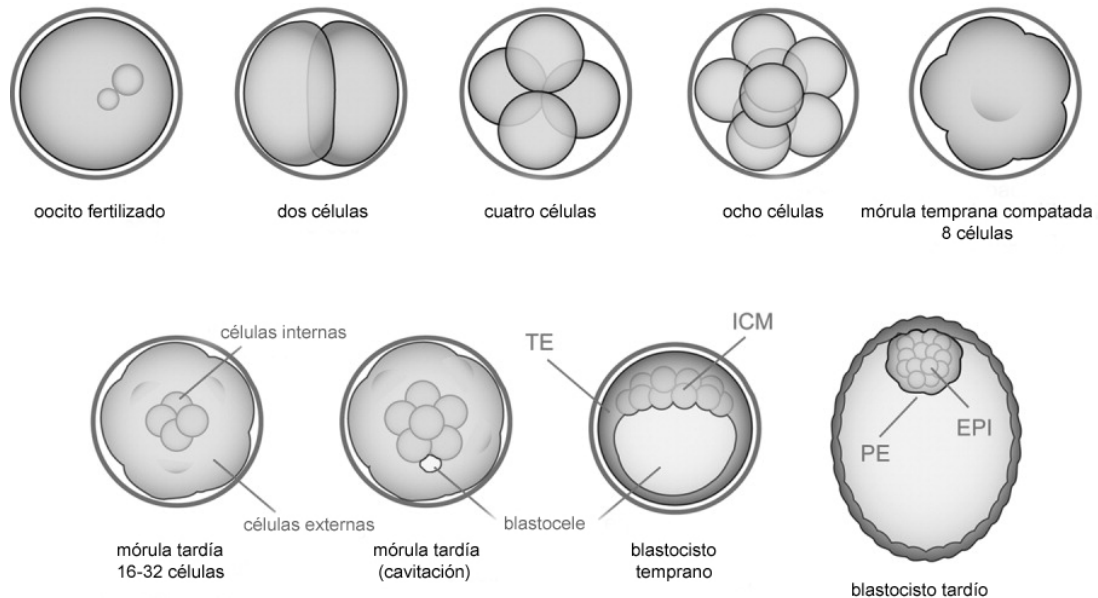
La fusión del espermatozoide y el oocito del ratón no conduce inmediatamente a la generación de un embrión con un patrón corporal bien definido como ocurre en el embrión de otras especies, como por ejemplo la rana o el caracol. Por el contrario, el embrión del ratón habrá de superar varios estadios previos a la gastrulación en los que las células que lo componen no verán su morfología ni sus potenciales movimientos restringidos físicamente por la presencia de la yema, que en esta especie no existe. Este tiempo es empleado por el embrión para generar un sistema de estructuras accesorias externo que le permitirá implantarse en el endometrio del útero y recibir nutrientes de la madre. De esta forma, la ausencia de la yema es clave en el embrión del ratón porque por una parte repercute sobre la forma como ha de nutrirse, pero lo que es aún más interesante, las células que componen el embrión permanecerán en un estado de indefinición durante un tiempo inusualmente largo mientras que el sistema de membranas externo queda establecido (Rothchild, 2003). Será sólo a posteriori cuando comience la especificación de las células y los territorios que componen el embrión propiamente dicho. Esta particularidad le sitúa lejos de otros animales que utilizan la yema para alimentarse por difusión a través del saco vitelino. Aunque en el embrión de ratón también se forma un saco vitelino, su capacidad de nutrición es más bien reducida y no es capaz de responder a la demanda de nutrientes que se requieren.

Como característica destacable del desarrollo de los mamíferos este sistema de tejidos extraembrionarios tendrá no sólo la función de dar un soporte físico a la implantación del embrión, si no que además participarán activamente en la especificación de las células que lo componen (Beddington and Robertson, 1999; Coucovanis and Martin, 1995; Rodriguez et al., 2005).

#### **3.1.2 Primeras divisiones:**

Durante los dos primeros días del desarrollo, el huevo fertilizado de ratón sufre una serie de divisiones mitóticas mediante las cuales incrementa su número de células, aunque no su tamaño neto. Así, el oocito fertilizado se convierte en un embrión de dos células, que posteriormente pasará por los estadios de cuatro, ocho, dieciséis y treinta y dos células. Durante todo este tiempo, el embrión se recubre de una envuelta glicoproteica denominada zona pelúcida. En este punto, todavía no se han especificado linajes celulares diferentes. Seguidamente, las células más externas de la mórula se diferencian al fenotipo de trofoectodermo, mientras que las internas quedan como masa celular interna. A su vez, se forma una cavidad en el interior rellena de líquido llamada blastocele. A continuación, dentro de la masa celular interna se segrega un tercer linaje, el endodermo primitivo. La estructura resultante se conoce como blastocisto (Fig. 1).

El desarrollo temprano del cigoto depende de las proteínas y el mRNA materno. Adicionalmente, en las últimas horas del estadio de una célula, previamente a la primera división mitótica, se produce una primera oleada de transcripción cigótica. Se conoce como activación génica cigótica 1 (ZGA-1).



**Figura 1:** Esquema de las divisiones tempranas que sufre el embrión del ratón, desde la fertilización hasta el estadio de blastocisto. El oocito sufre sucesivas divisiones mitóticas con las que incrementa su número de células pero no su tamaño absoluto. Tras la tercera división se produce la compactación y polarización de los blastómeros. Esto genera diferencias entre células internas y externas en el embrión, que en último término se diferencian a los linajes de la masa celular interna (ICM) y el trofoectodermo (TE) respectivamente. Este fenómeno, unido a la entrada de líquido en el embrión (cavitación) produce un cambio por el que se genera el blastocisto. En el blastocisto tardío podemos apreciar ya los tres linajes bien diferenciados del trofoectodermo, el epiblasto (EPI) y el endodermo primitivo (PE). Modificado de Yamanaka (2006).

Sin embargo, es tras la primera replicación del DNA en el estadio de dos células cuando se produce un pico de transcripción de mayor entidad, conocido como activación génica cigótica 2 (ZGA-2). Durante esta fase se da una gran pérdida de mRNA materno, aunque las proteínas maternas persisten, para ser modificadas post-traduccionalmente y funcionar junto con las proteínas recién sintetizadas hasta estadios posteriores (Schultz, 2002).

Tras las tres primeras divisiones (embrión de 8 células), el embrión del ratón sufre el primer evento morfogénico, la compactación. Mediante este proceso se incrementa la superficie de los contactos célula-célula (Pratt et al., 1982). Esto conlleva un aplanamiento en la morfología de los blastómeros, pero además va unido a otro fenómeno que aunque independiente, es difícil de considerar por separado: la polarización. Esta polaridad se da en las células externas que se organizan axialmente desde el centro del embrión (baso-lateralmente) hacia la superficie (apicalmente), generando las primeras diferencias morfológicas. Además, ocurre a todos los niveles: en el citocórtex (Ducibella and Anderson, 1975; Reeve and Ziomek, 1981), en el citoplasma (Fleming et al., 1986a; Fleming and Pickering, 1985; Maro et al., 1985; Reeve,

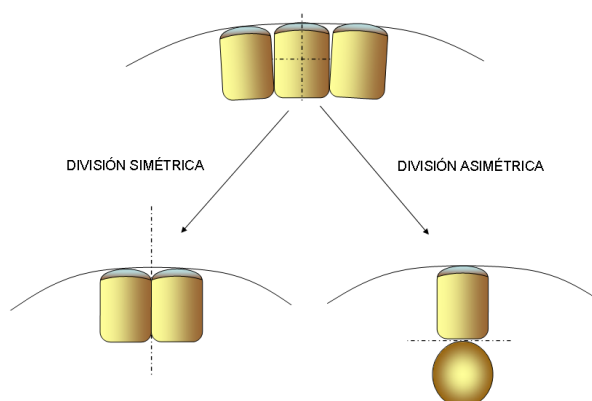
1981) y en el citoesqueleto (Houlston et al., 1987; Johnson y Maro, 1984). Las diferencias que mayor impacto tendrán en las fases posteriores radican en el polo apical. Este polo se caracteriza por una densa población de microvilli, al contrario de lo que ocurre en el polo basolateral (Fleming et al., 1986b).

Tanto la compactación como la polarización vienen dados en gran medida por la molécula de adhesión E-cadherina. Su localización en la membrana y sus propiedades adhesivas implican también al complejo que forma con *inter alia*, y las  $\alpha$ E-catenina (Torres et al., 1997),  $\beta$ - y  $\gamma$ -cateninas. Durante la polarización, la E-cadherina se restringe a la región basolateral de los blastómeros (Vestweber et al., 1987). La importancia de la E-cadherina queda patente en los mutantes homocigotos para este gen, en los que las células de la mórula se disocian unas de otras al poco de iniciarse la compactación y pierden su polaridad. Por tanto, la E-cadherina materna es suficiente para iniciar el proceso, pero no se puede mantener sin los transcritos embrionarios (Riethmacher et al., 1995). Alrededor del momento de la compactación, la  $\beta$ -catenina sufre también una relocalización hacia esta zona de la célula (Pauken y Capco, 1999).

Asociada a los microvilli apicales aparece la Ezrina, que parece estabilizar estas estructuras (Bretscher et al., 2000), acompañada de diferentes isoformas de la proteína kinasa C (PKC) y la proteína PAR (Pauken y Capco, 2000; Plusa et al., 2005; Thomas et al., 2004). Se cree que estos complejos son fundamentales para la formación del blastocisto, ya que podrían estar implicados en iniciar las señales que llevan a la expresión diferencial de los factores de transcripción que caracterizan al trofoectodermo.

### 3.1.3 La mórula:

Una vez que esto ha ocurrido, las células polarizadas se pueden dividir asimétricamente, generándose diversidad morfológica por primera vez en el embrión. Así, se producirán los blastómeros del embrión de 16 células que diferirán en función de si se originaron en las regiones apicales o si provienen exclusivamente de las regiones basolaterales, aunque no se conoce el mecanismo que determina el que una división sea simétrica o asimétrica (Johnson y Ziomek, 1982; Ziomek y Johnson, 1982; Ziomek et al., 1982; Fig. 2). Desde este momento habrá, por tanto, células internas apolares rodeadas de células superficiales polares (Fleming y Johnson, 1988; Fleming et al., 2000). A continuación, el embrión sufre nuevas rondas de división que le hacen pasar por los estadios de treinta y dos y sesenta y cuatro células.



**Figura 2:** El esquema representa los dos tipos de divisiones que pueden sufrir los blastómeros en el embrión de 16 células. Los blastómeros externos están polarizados y poseen una serie de factores que se localizan específicamente en su polo apical, como la Ezrina, PKC o PAR. Cuando estos blastómeros sufren una división simétrica, las dos células hijas heredan estos factores del polo apical y siguen siendo células polarizadas. Sin embargo, cuando las células externas se dividen asimétricamente la célula que queda en la cara interna no hereda el componente apical y se convierte en una célula apolar.

### **3.1.4 El blastocisto:**

Durante las fases subsiguientes, el embrión pasa del estadio de mórula al de blastocisto. Éste es uno de los momentos más relevantes de todo el proceso de desarrollo del ratón. A partir de esta masa aparentemente indiferenciada de células se generará una estructura en la que se segregan claramente y por primera vez dos linajes celulares diferentes: el trofoectodermo, que ocupará la capa más externa, y la masa celular interna, que como su nombre indica quedará en el interior. Justo en el momento en el que esto ocurre, las células externas inician un transporte activo mediado por canales de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que permite la entrada de líquido para formar una cavidad interna denominada blastocele, lo que se conoce como proceso de cavitación (Watson y Barcroft, 2001).

En los estadios posteriores del desarrollo, el trofoectodermo se diversifica produciendo un buen número de estructuras que darán lugar a la mayor parte de los tejidos que componen la placenta. Por otra parte, la masa celular interna, que forma un grupo de células concentradas en uno de los extremos del blastocele producirá el embrión en sí más algunos de los tejidos extraembrionarios. (Fleming, 1987; Pedersen et al., 1986)

Para intentar comprender cómo se generarán las primeras asimetrías en el embrión y por tanto los futuros ejes del embrión, es crítico conocer el origen de los linajes y tipos celulares que componen el blastocisto.

### **3.1.5 Especificación de los primeros ejes y linajes:**

La disposición que toman las células del blastocisto marca el primer eje del embrión del ratón, en el que el extremo que ocupa la masa celular interna se denomina polo embrionario, mientras que el extremo opuesto será el polo abembrionario. Se ha postulado una posible relación entre este eje embrionario-abembrionario y los futuros ejes del embrión. Ciertas observaciones apuntan a que el eje animal-vegetal del embrión sería perpendicular al eje embrionario-abembrionario y se asociaría al eje de simetría bilateral del animal (Gardner, 1997). También se ha asociado el eje embrionario-abembrionario al futuro eje dorsoventral del animal (Rossant y Tam, 2004), aunque si bien coinciden topológicamente aún no está claro que uno sea el precursor del otro.

La porción del trofoectodermo en contacto con la masa celular interna se denomina trofoectodermo polar, mientras que el resto será el trofoectodermo mural (Rossant y Tam, 2004). No hay que olvidar que esta denominación responde meramente a su posición, ya que fenotípicamente ambos tipos de trofoectodermo son indiferenciables. No parece por tanto que se trate de dos tipos celulares diferentes, y de hecho no existen marcadores moleculares que les diferencien.

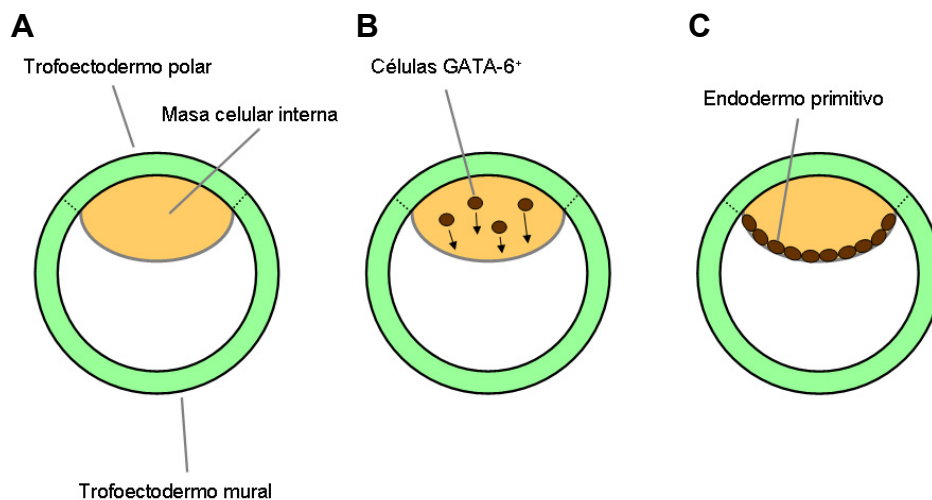
Tras el establecimiento del trofoectodermo y la masa celular interna ocurre una segunda decisión de linaje por la que ciertas células de la masa celular interna adquieren un perfil molecular diferente y se segregan, migrando hacia la superficie externa de la masa celular



interna y quedando en contacto con el blastocele. Esta monocapa de células constituye el endodermo primitivo, que dará lugar a una parte de los tejidos extraembrionarios (Rossant et al., 2003). La parte restante de la masa celular interna constituye el epiblasto y producirá el embrión propiamente dicho, así como el mesodermo extraembrionario (Papaioannou, 1982; Fig. 3).

### 3.1.6 La eclosión:

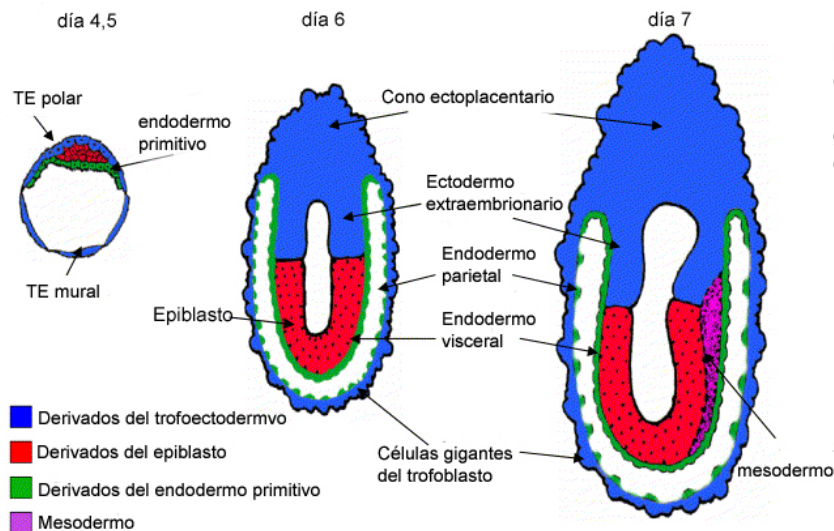
Posteriormente, se da la eclosión, en la que el blastocisto se expande y sale de la zona pelúcida para implantarse en el endometrio del útero a través del trofoectodermo polar (Cross, 2006). Esta parte del trofoectodermo continúa dividiéndose, produciendo el ectodermo extraembrionario, que empuja al epiblasto hacia el extremo opuesto junto con el endodermo primitivo que lo envuelve, en adelante, el endodermo visceral. Así, el epiblasto deja una cavidad en la parte central y adquiere forma de copa. Las células del endodermo primitivo en contacto con la superficie interna del trofoectodermo mural forman el endodermo primitivo parietal. El trofoectodermo mural y el endodermo primitivo parietal forman el saco vitelino parietal y junto con la membrana basal del trofoectodermo mural (membrana de Reichert) engloban a todo el embrión.



**Figura 3:** Representación esquemática de los linajes que componen el blastocisto. Inicialmente, el blastocisto cuenta con dos linajes: el trofoectodermo en la porción más externa y la masa celular interna en el interior (**A**). A continuación, dentro de la masa celular interna se distinguen células que comienzan a expresar *Gata6*, entremezcladas aleatoriamente con el resto (**B**). Las células que expresan *Gata6* migrarán hacia la superficie de la masa celular interna en contacto con el blastocele y se dispondrán en forma de monocapa, constituyendo lo que se conoce como endodermo primitivo (**C**).

Durante las fases siguientes, una población específica de células del endodermo visceral distal migra hacia un lado del embrión e instruye a las células del epiblasto, confiriéndoles carácter anterior. En el extremo opuesto del epiblasto las células sufren una transición epiteliomesénquima que genera el mesodermo y comienzan a invaginarse dando lugar así a la línea primitiva. Así, comienza la gastrulación en el ratón. Estos fenómenos suponen la especificación

del primer eje del embrión propiamente dicho, que será el eje anteroposterior (Beddington y Robertson, 1999; Fig. 4).



**Figura 4:** Derivados de los tres linajes que componen el blastocisto hasta el momento de la gastrulación. Modificado de Rossant (2004).

### 3.2 ¿Cuándo se determinan los linajes que componen el blastocisto del ratón?

Los oocitos de otras especies tienen una clara polaridad, con polos animal y vegetal bien diferenciados (Bates y Jeffery, 1988). También se sabe que el punto de entrada del espermatozoide en el oocito, es decir, la fertilización, es crítico para el establecimiento ulterior de los ejes en algunas especies. Por ejemplo, en las ascidias el punto de entrada del espermatozoide inicia una serie de eventos de reorganización en el citoplasma que ubica a los determinantes en zonas concretas del cigoto antes de la primera división (Sawada y Schatten, 1989). En la rana, el punto de entrada del espermatozoide tiene una gran repercusión sobre la orientación de la rotación cortical, que en último término determinará el eje dorsoventral del animal (Gerhart et al., 1981).

En muchas especies se produce un tipo de desarrollo denominado mosaico. En ellas, la madre aporta factores que se denominan determinantes y que se distribuyen de forma asimétrica en el oocito, formando precisamente este eje animal-vegetal. Tras la fertilización, el cigoto comienza a dividirse de forma que tras dos divisiones los blastómeros han heredado de forma diferencial estos determinantes, ya no son equivalentes y tienen un potencial restringido y diferente. De hecho, la eliminación selectiva de blastómeros en estos estadios del desarrollo no puede ser compensada por los blastómeros vecinos. Además, las divisiones tienen lugar de una forma estereotipada que genera ya desde el principio diferentes tipos de blastómeros. El destino de las diferentes células que componen el embrión no viene dado por las interacciones entre ellas, sino que son las diferencias intrínsecas que los blastómeros adquieren desde el comienzo las que llevan al establecimiento de los primeros linajes del embrión. Este desarrollo en mosaico es el que sufren, por ejemplo, la rana o el erizo de mar, en los que la disposición de las capas

germinales viene dada por la distribución diferencial de ciertos factores a lo largo del eje animal-vegetal del oocito (Gilbert, 2003).

No es ésta la situación en el embrión del ratón, que sufre en cambio un desarrollo regulado. En este caso no hay aparentemente una información posicional en los blastómeros que les indique de forma inequívoca cuál será su destino. Es el juego de interacciones que sufren a lo largo de las sucesivas divisiones lo que acaba por posicionarles en el embrión.

### **3.2.1 ¿Cuándo surgen las diferencias entre los blastómeros que componen el embrión?**

Tradicionalmente se ha cuestionado la idea de si el embrión del ratón posee también algún tipo de determinantes moleculares que desde el momento de la fertilización sirvan como guías para la posterior formación del patrón corporal básico. Sin embargo, parece utilizar una estrategia diferente, ya que no tiene una clara polaridad en los estadios tempranos y por el momento no se conocen moléculas que se distribuyan formando gradientes o contribuyan al establecimiento de los primeros linajes desde las primeras divisiones (Yamanaka et al., 2006).

Al contrario de los embriones de otras especies que poseen una yema, el embrión del ratón no cuenta con esta limitación espacial. Por ello, los blastómeros se pueden dividir potencialmente en las tres dimensiones y desplazarse de forma dinámica durante estas primeras fases. Para el embrión del ratón, la ausencia de esta restricción se convierte en una ventaja para prolongar el estado de indeterminación de las células que lo componen (Johnson y McConnell, 2004). En el embrión del ratón las primeras divisiones son iguales y todos los blastómeros retienen la capacidad de generar todos los linajes hasta el estadio de ocho células. Además, la eliminación de blastómeros en estos estadios no afecta decisivamente al desarrollo posterior del embrión (Zernicka-Goetz, 1998). Asimismo, los blastómeros de la parte externa de la mórula más tardía pueden producir derivados de la masa celular interna, ya que no se encuentran irreversiblemente determinados hasta momentos más posteriores (Hillman y Charney, 1972; Hogan y Tilly, 1978; Tarkowski y Wroblewska, 1967). Todo esto indica que el desarrollo temprano del ratón se rige por un programa relativamente flexible, lo cuál dificulta el conocimiento de los mecanismos que dirigen la especificación de los primeros linajes. No obstante, este es un aspecto controvertido ya que estudios recientes apuntan en la dirección contraria, indicando una cierta predeterminación ya desde los blastómeros más tempranos para dar lugar a destinos concretos en el embrión (Zernicka-Goetz, 1998).

De forma análoga a otras especies, también se ha investigado en el ratón el posible papel del punto de entrada del esperma en el oocito, así como la posición del polo animal y el segundo cuerpo polar (un remanente de la segunda división meiótica que precede a la formación del oocito). Algunas de las preguntas por resolver son la influencia del punto de entrada del esperma sobre la polaridad del oocito y la posición del eje de la primera división; si el polo animal del oocito está asociado a este eje y se puede identificar por la presencia del cuerpo polar; y por último, si la orientación del eje de la primera división depende de señales

intrínsecas o extrínsecas. Nuevamente, hay opiniones tanto a favor (Piotrowska y Zernicka-Goetz, 2001), como en contra (Motosugi et al., 2005) de la influencia de la fertilización en la posterior determinación de la estructura del blastocisto. Sin embargo, es sabido que el blastocisto del ratón puede generarse *in vitro* sin la intervención del espermatozoide ni de factores extrínsecos (revisado en Johnson, 2004). Esto sugiere que probablemente exista un sistema por el que los blastómeros son capaces de orientarse en función de otras claves como los contactos que establecen entre ellos, mediadas por programas genéticos intrínsecos.

### **3.2.2 La orientación del eje de la primera división mitótica:**

A su vez, la orientación del eje de la primera división mitótica recibe gran atención. Su posible influencia en la estructura del blastocisto y, por tanto, en el origen de los dos primeros linajes es también objeto de controversia. En otras especies esta división está claramente relacionada con la disposición de los ejes en el plan corporal final. Por ejemplo, en el nematodo *C. elegans* el plano de la primera división es perpendicular al eje anteroposterior del animal, mientras que en las ascidias es paralelo (Gilbert, 2003). En el caso del ratón, los experimentos clásicos concluían que ambos blastómeros del embrión de dos células pueden contribuir a cualquier parte del cuerpo del animal (Rossant, 1976; Tarkowski, 1959; Tarkowski, 1961). Sin embargo, en los últimos años se han publicado trabajos que enuncian conclusiones eminentemente contradictorias a este respecto. Algunos estudios afirman que hay una cierta relación entre el eje de la primera división y el eje embrionario-abembrionario. Estas investigaciones proponen una contribución preferencial de uno de los dos blastómeros a la mitad del blastocisto que ocupa la masa celular interna. Así, habría una segregación desigual de determinantes morfogénicos en el cigoto (Gardner, 1997; Gardner, 2001; Piotrowska y Zernicka-Goetz, 2001). Por otra parte, otros estudios publicados recientemente llegan a conclusiones similares a las de los trabajos clásicos y proponen justo lo contrario, con lo que no habría relación alguna entre el plano de la primera división y el eje del blastocisto (Alarcon y Marikawa, 2005; Chroscicka et al., 2004; Fujimori et al., 2003; Motosugi et al., 2005). En cualquier caso, también parece difícil establecer el límite entre ambas mitades del blastocisto para poder hacer un buen análisis clonal de la contribución de cada blastómero, lo que añade un cierto grado de subjetividad al análisis.

Al hilo de esta creciente controversia (Hiiragi et al., 2006), en el presente trabajo intentamos responder a la pregunta de si existe o no una contribución específica de cada uno de los dos primeros blastómeros del embrión a territorios o poblaciones celulares concretas en el blastocisto. Queremos saber si ya desde el estadio de dos o cuatro células se puede hablar de una determinación como parte del mecanismo de especificación de los dos primeros linajes.

Para ello, hemos utilizado un sistema de trazado genético de linaje mediante la administración de tamoxifeno. Con ello, pretendemos estudiar estos eventos tempranos sin interferir físicamente con las células que componen el embrión, que como ha quedado de manifiesto es muy sensible a cualquier manipulación en esta parte del desarrollo.

### **3.3 Control genético de la especificación de los primeros linajes del blastocisto del ratón.**

A medida que se especifican los linajes del blastocisto en el desarrollo temprano, también se establecen patrones de expresión concretos para determinados genes que caracterizan a cada tipo celular. Sin embargo, queda aún sin contestar claramente la pregunta de si son estos genes los que de forma causal originan diferentes linajes en el blastocisto, o si su expresión es la respuesta a otras diferencias anteriores.

#### **3.3.1 La especificación de la masa celular interna:**

La masa celular interna se especifica en el momento de la formación del blastocisto. Durante este proceso, en las células internas de la mórula se restringe la expresión de un gen clave, *Oct4*, que hasta entonces se expresaba en todas las células del embrión. El gen *Oct4* (*Pou5f1*), que codifica para un factor de transcripción de la familia POU (Scholer et al., 1990) se expresa ya desde la oogénesis y a lo largo de las primeras divisiones, para acabar restringiéndose progresivamente a la masa celular interna y finalmente al epiblasto (Scholer et al., 1989). El ratón mutante para este gen ha demostrado que *Oct4* es imprescindible para la formación de la masa celular interna, frente al linaje del trofoectodermo. Esta mutación produce la muerte del embrión en el momento de la peri-implantación, ya que todas las células acaban por adquirir las características del trofoectodermo y no se genera una masa celular interna (Nichols et al., 1998). Este resultado se puso de manifiesto también en trabajos realizados con células madre embrionarias (ES) que se derivan de la masa celular interna y expresan *Oct4* en condiciones normales (Niwa et al., 2000). En estos experimentos, la supresión condicional de la expresión de *Oct4* llevó a la diferenciación hacia un fenotipo similar al de las células del trofoectodermo, así como a la expresión de marcadores típicos de este linaje. Esto parece indicar que la vía de diferenciación hacia el trofoectodermo se desencadena en ausencia de *Oct4*.

Además, parece que *Oct4* no interviene en solitario en la especificación de la masa celular interna. Para que este linaje se forme se requiere el concurso de *Sox2*, que se coexpresa junto con *Oct4* y refuerza su papel. *Sox2* codifica un factor de transcripción de tipo SOX, que se une al DNA a través de un motivo HMG. El ratón mutante para *Sox2* también muere inmediatamente después de la implantación y muestra un desarrollo del epiblasto muy reducido, lo cuál sugeriría la importancia del complejo *Oct4/Sox2* para la formación de este tejido. *Sox2* y *Oct4* se expresan durante las primeras divisiones, así como en la masa celular interna y el epiblasto (Collignon et al., 1996). Ambos genes parecen regular conjuntamente la expresión de *Fgf4*, un factor de crecimiento clave en el desarrollo de la masa celular interna (Yuan et al., 1995). Asimismo, también parecen colaborar en la regulación positiva de *Oct4* uniéndose conjuntamente a un elemento autorregulatorio situado en un *enhancer* distal de este gen (Okumura-Nakanishi et al., 2005).

Pero el mantenimiento de la pluripotencia y la inhibición de la diferenciación de las células de la masa celular interna parece un proceso más complejo, en el que *Oct4* no sería el único gen involucrado. En las células ES, *Oct4* no es suficiente para mantener la pluripotencia en ausencia de factores de crecimiento añadidos al medio tales como el factor inhibidor de la leucemia (LIF; Niwa et al., 2000). Por tanto, debe de haber otros factores que intervienen después de LIF (*downstream*) que se ocupen de mantener la pluripotencia de estas células.

Pero el mantenimiento de la pluripotencia no es el único parámetro que se ha de tener en cuenta al establecer los linajes del blastocisto. Por el contrario, es fundamental también conocer los fenómenos mediante los cuáles la masa celular interna da lugar al endodermo primitivo y el epiblasto. En los últimos años, dos grupos han aislado independientemente el gen con homeobox *Nanog*, por su capacidad de mantener la pluripotencia en células ES con independencia del factor LIF (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Se ha demostrado también la importancia de *Nanog* en el mantenimiento de las poblaciones que conforman la masa celular interna y el epiblasto. De esta forma, en los ratones mutantes homocigotos para *Nanog* tanto las células de la masa celular interna como las células ES se diferencian, esta vez a células del endodermo primitivo (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Esto remarcaría la importancia de *Nanog* a la hora de mantener el epiblasto e inhibir la diferenciación hacia endodermo primitivo.

La especificación del endodermo primitivo viene dada por un proceso en el que determinadas células de la masa celular interna comienzan a expresar el gen *Gata6* (Fig. 3B). Estas células no expresan *Nanog* y se encuentran entremezcladas con el resto de las células que sí lo expresan, y que a su vez no expresan *Gata6*. De alguna forma que todavía no conocemos en detalle, estas células son “elegidas” para migrar a la superficie en contacto con el blastocelo de la masa celular interna y quedan ubicadas en forma de monocapa. Aunque no se conocen aún a ciencia cierta los genes diana de *Nanog*, se ha observado que *Gata6* tiene lugares de unión para *Nanog* y que se incrementa su expresión en células ES que no expresan *Nanog*, lo que indica que *Nanog* estaría inhibiendo la expresión de *Gata6* (Chazaud et al., 2006).

### **3.3.2 La especificación del trofoectodermo: *Cdx2*.**

En cuanto a la especificación del trofoectodermo, no ocurre sencillamente por defecto en la ausencia de *Oct4*. Por el contrario, el factor de transcripción *Cdx2*, parece tomar parte activamente en este proceso. *Cdx2* codifica para una proteína de tipo homeodominio y es ortólogo al gen *caudal* de *Drosophila*. *Cdx2* Se expresa en todos los blastómeros del embrión de 16 células y se restringe exclusivamente a la capa externa posteriormente (Beck et al., 1995; Dietrich y Hiiragi, 2008). En el ratón *knockout* para este gen se empieza a formar el blastocelo pero no se mantiene la integridad del epitelio externo y el blastocisto no es capaz de implantarse. Además, no se reprime la expresión de *Oct4* y *Nanog* en las células externas, que acaban muriendo (Chawengsaksophak et al., 1997).

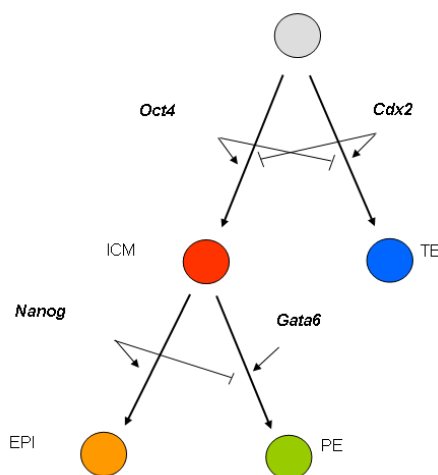
Se ha demostrado la posibilidad de derivar células madre del trofoblasto (TS) de embriones de ratón tanto en el estadio E3.5 como en E6.5, que expresan todos los marcadores y poseen las características morfológicas que exhiben las células del trofoectodermo en el blastocisto (Tanaka et al., 1998). Sin embargo, no se pudieron obtener estas células cuando se partió de embriones mutantes para *Cdx2* (Strumpf et al., 2005). También se ha demostrado que tanto la supresión de la expresión de *Oct4* (Niwa et al., 2000) como la sobreexpresión de *Cdx2* en células ES les lleva a convertirse en células con características fenotípicas del trofoectodermo (Niwa et al., 2005). Por tanto, se podría decir que cuando se segregan los dos primeros linajes del blastocisto, *Cdx2* tiene un papel clave gracias a su capacidad de reprimir la expresión de *Oct4* y *Nanog* en las células del trofoectodermo, así como para el mantenimiento de éste último.

A nivel molecular, también se ha descrito una interacción directa de los factores *Cdx2* y *Oct4* a la hora de impedir la diferenciación hacia trofoectodermo. Según esto, formarían un complejo represor que interferiría con la capacidad de autorregulación que ambos genes poseen. De esta forma, se produciría un sistema de inhibición recíproca que restringiría a *Cdx2* al trofoectodermo y *Oct4* a la masa celular interna. La regulación a la baja de *Oct4* produciría una regulación a la alza de *Cdx2* y viceversa (Niwa et al., 2005).

También se ha descrito la presencia de otros factores de transcripción que colaboran en la especificación y el mantenimiento del trofoectodermo. Todos ellos tienen un patrón de expresión recíproco al de *Oct4* en el embrión temprano y se restringen finalmente al trofoectodermo en el estadio de blastocisto. Entre ellos, destaca *Eomesodermina* (*Eomes*), que codifica para un factor de transcripción de tipo T que se expresa en el trofoectodermo (Ciruna y Rossant, 1999; Russ et al., 2000) y en el trofoblasto, su primer derivado (Hancock et al., 1999). Al contrario de lo que ocurre con los mutantes de *Cdx2*, los embriones nulos para *Eomes* llegan a implantarse, aunque mueren algo después. En este caso se producen blastocistos en los que se forma y se mantiene el blastocelo, de lo que se deduce que hay un trofoectodermo funcional (Ciruna y Rossant, 1999; Russ et al., 2000). Además, *Cdx2* se expresa normalmente y *Oct4* acaba por restringirse a la masa celular interna, con lo que *Eomes* no se requiere para la segregación inicial de la masa celular interna y el trofoectodermo.

Recientemente se ha descrito otro gen que podría contribuir a la especificación del trofoectodermo. Se trata del gen *Tead4*, que codifica un factor de transcripción de la familia de dominio TEA. Los ratones mutantes de *Tead4* mueren antes de la implantación, sin siquiera formar un blastocelo, aunque la polaridad de las células y sus uniones no se ven afectadas. La ausencia de este gen hace que todos los demás marcadores del trofoectodermo tampoco estén presentes. Por el contrario, todos los blastómeros expresan marcadores característicos de la masa celular interna, como *Oct4* y *Nanog*. Por ello, en este momento del desarrollo *Tead4* es imprescindible para la especificación del trofoectodermo, probablemente con anterioridad a *Cdx2* (Nishioka et al., 2008; Yagi et al., 2007).

En conclusión, la decisión de que un blastómero adquiera su destino final depende de la expresión localizada y restringida de ciertos factores tanto positivos como negativos. *Oct4* promueve la formación de la masa celular interna mientras que *Cdx2* promovería la diferenciación del trofoectodermo. Al mismo tiempo *Cdx2* inhibe la formación de la masa celular interna. Dentro de la masa celular interna, *Oct4*, junto con *Nanog*, promueve el fenotipo del epiblasto e inhibe la formación del trofoectodermo. A la vez, *Nanog* inhibe la diferenciación del epiblasto a endodermo primitivo. *Gata6* promovería según este modelo la formación del endodermo primitivo dentro de la masa celular interna, mientras que inhibiría la formación del epiblasto (Rossant, 2004; Fig. 5).



**Figura 5:** Este modelo representa la especificación progresiva de los linajes que componen el blastocisto. La diferenciación del trofoectodermo frente a la masa celular interna vendría dada por la expresión restringida de *Cdx2* y *Oct4* respectivamente. Una vez que esto ocurre, las células de la masa celular interna se diferenciarán a endodermo primitivo si expresan *Gata6* y quedarán como epiblasto si expresan *Nanog*. Modificado de (Rossant, 2004).

Indudablemente, en los últimos años se ha generado un gran volumen de conocimiento sobre los eventos que tienen lugar durante la fase de preimplantación. Pero aún así todavía no conocemos a ciencia cierta los mecanismos que inician las diferencias a nivel molecular entre los blastómeros y el establecimiento de los linajes. Por una parte existen evidencias de que *Cdx2* se expresa inicialmente de forma inespecífica y fluctuante por toda la mórula y *Oct4* se sigue expresando en el trofoectodermo hasta momentos muy tardíos (Dietrich y Hiiragi, 2008). Además, se sabe también que los blastómeros mutantes para *Cdx2* pueden contribuir al trofoectodermo (Ralston y Rossant, 2008). Por otra parte, la expresión de *Nanog* es aparentemente aleatoria en los blastómeros que componen la mórula en los momentos previos a la formación del blastocisto (Dietrich y Hiiragi, 2008). Es importante resaltar también el hecho de que las células ES mutantes para *Nanog* son capaces de contribuir en quimeras a todas las capas germinales que componen el embrión (Chambers et al., 2007).

Todo hace pensar entonces que podrían darse antes de la intervención de estos factores otros mecanismos que establecen inicialmente las diferencias entre linajes. Probablemente se den eventos a nivel molecular con anterioridad a la función de *Cdx2* que regulen la polaridad y la epitelialización de las células externas, pero también de manera directa o indirecta la restricción de la expresión de *Cdx2*. Así, este epitelio inicial adquiriría su plena identidad de trofoectodermo cuando *Cdx2* se restringe a él y regula la expresión de toda una batería de genes diana específicos de este linaje.



Por ello, para entender cómo se especifican los linajes es clave el conocer los mecanismos que están detrás de la restricción de la expresión de los mencionados genes y de su regulación. Según los trabajos hasta ahora mencionados, *Cdx2* es el factor de transcripción más temprano que se requiere para la diferenciación del trofoectodermo y que muestra expresión restringida en este linaje. Por tanto, en este trabajo nos hemos concentrado en el estudio en detalle de su mecanismo de regulación, que consideramos crítico para ahondar en el conocimiento del control genético de la segregación de los dos primeros linajes del embrión del ratón.

### 3.4 Origen evolutivo de *Cdx2*:

*Cdx2* pertenece al complejo de genes Parahox, que se considera parálogo al complejo de los genes Hox. El grupo Parahox fue descubierto originalmente en el cefalocordado anfibio y consta de los genes *AmphiCdx* (*Cdx1*, 2 y 4, en mamíferos), *AmphiXlox* (*Pdx-1* en los mamíferos) y *AmphiGsx* (*Gsx1* y 2 en los mamíferos; Brooke et al., 1998). En el anfibio, los tres genes se encuentran físicamente muy próximos, como ocurre en ratón, en el que *Cdx2* se localiza junto a *Pdx1* y *Gsx1*. Teniendo en cuenta que estos genes son tan similares a los Hox como algunos de éstos entre sí, se postula un origen común para ambos grupos. De esta forma, los Hox y los Parahox serían grupos de genes parálogos que comparten un ancestro común del que provienen y que se ha denominado grupo Protohox (García-Fernández, 2005). Curiosamente, el orden en el que se disponen los genes del grupo Parahox tanto en el anfibio como en otras especies se corresponde con el orden en el que se expresan con respecto al eje anteroposterior del animal. Por ello, se podría hablar de colinearidad (Brooke et al., 1998), al igual que para los genes Hox (McGinnis y Krumlauf, 1992). Sin embargo, en el presente trabajo no trataremos los aspectos relacionados con la especificación del eje anteroposterior ni aquellos eventos que ocurren en momentos más tardíos y son comunes a la mayoría de los vertebrados. Por el contrario, nos centraremos en el estudio *Cdx2* por su importancia en la especificación del trofoectodermo en el linaje de los mamíferos y su papel en la aparición de esta novedad evolutiva.

En el ratón, *Cdx2* se expresa en el embrión en los estadios de preimplantación (Dietrich y Hiiragi, 2008), y posteriormente en estadios de postimplantación, en las porciones más caudales del embrión. En el embrión tardío y ya en el adulto, se restringe al epitelio intestinal, con los mayores niveles de expresión en el colon proximal (Beck et al., 1995), donde tiene una gran implicación en el cáncer de colon (Chawengsaksophak et al., 1997).

En los estadios de preimplantación, la expresión de *Cdx2* se da con una cierta variabilidad. En el momento de la compactación, no se ha detectado la presencia de *Cdx2*. Sin embargo, su expresión incrementa a partir de este punto y en el estadio de 16 blastómeros, todas o casi todas las células son positivas. Cuando se está empezando a formar el blastocisto temprano, *Cdx2* solo se expresa intensamente en las células de la superficie externa; a medida que pasen las horas, quedará totalmente restringida al trofoectodermo (Dietrich y Hiiragi, 2008). Al cabo

de 5,5 días de desarrollo ya se ha producido la implantación y la expresión de *Cdx2* se da únicamente en el ectodermo extraembrionario. En el día 6,5, este tejido sigue siendo positivo para *Cdx2* (Beck et al., 1995).

A los 7,5 días, *Cdx2* se localiza en el corion y el cono ectoplacentario, que derivan del trofoectodermo, aunque también se expresa en el mesodermo del primordio del alantoides. Todos los tejidos del primordio de la cola exhiben expresión de *Cdx2* al día siguiente del desarrollo (E8,5). Más anteriormente, la placa neural, el tubo neural y la notocorda también presentan expresión de *Cdx2*. En el día 9,5 del desarrollo todos los tejidos que conforman el primordio de la cola siguen siendo positivos para *Cdx2*. Al avanzar rostralmente, el tubo neural, la notocorda y el tubo digestivo posterior presentan expresión, aunque se observa un claro límite anterior en el punto que separa el tubo digestivo posterior del intermedio. En cuanto a los otros genes de tipo *caudal*, la expresión de *Cdx1* alcanza niveles más anteriores en el tubo neural en E7.5. Sin embargo, en los días siguientes, su expresión se limita a la altura de la médula espinal. Además, se expresa en la línea primitiva y en el primordio de la cola (Meyer y Gruss, 1993). El patrón de *Cdx4* está restringido a las zonas más posteriores. Su expresión se detecta por primera vez a muy bajos niveles en el alantoides y en el extremo posterior de la línea primitiva, formando un gradiente que incrementa hacia los niveles más caudales (Gamer y Wright, 1993). Posteriormente, a los 12,5 días de desarrollo, la expresión de *Cdx2* se restringe al endodermo del tubo digestivo y al tallo del saco vitelino (Beck et al., 1995), mientras que *Cdx1* y *Cdx4* se extinguen completamente (Gamer y Wright, 1993; Meyer y Gruss, 1993).

En conclusión, la expresión de *Cdx2* en el trofoectodermo lo diferencia de los otros miembros de su familia, *Cdx1* y *Cdx4*. Estos genes no se expresan en momentos tan tempranos, pero comparten con *Cdx2* la cualidad de aparecer con mayores niveles en la parte posterior, a partir del estadio E7.5 (Gamer y Wright, 1993; Meyer y Gruss, 1993).

Los homólogos de *Cdx2* en otros vertebrados se expresan durante la gastrulación, predominantemente en las zonas posteriores en torno a la línea primitiva (Blumberg et al., 1991; Morales et al., 1996; Northrop y Kimelman, 1994). En el caso del pollo, un estudio previo dedicó cierta atención a la expresión de *Cdx2* en el epiblasto, llegando a la conclusión de que también se restringe a la zona posterior de la línea primitiva (Marom et al., 1997). En *Drosophila*, el gen ortólogo de *Cdx2*, *caudal*, es necesario para los procesos de gastrulación y regionalización de la porción posterior del embrión, concretamente del tubo digestivo posterior y del disco imaginal genital (Moreno y Morata, 1999). Por tanto, parece claro que estos genes forman un gradiente transitorio en el extremo posterior del embrión, que a su vez coopera en la formación del eje anteroposterior. Esta expresión relacionada con la parte caudal del embrión es común a todos, lo que parece reflejar un papel primitivo en el ancestro común de los metazoos.

### **3.5 Comparación del desarrollo pre-gastrulación de mamíferos con otros vertebrados. El embrión del pollo.**

En este trabajo pretendemos ahondar en el conocimiento de los mecanismos que contribuyen a la formación del blastocisto, pero también pretendemos saber algo más de su origen evolutivo. Por esta razón, hemos empleado el pollo como modelo para hacer un estudio comparado de la expresión de *Cdx2* en los estadios más tempranos, que en ciertos aspectos serían equiparables a los estadios de preimplantación del embrión del ratón. El pollo supone para este propósito un modelo ideal por su posición evolutiva dentro del grupo de los vertebrados. Aunque está más próximo que otros vertebrados como los peces o los anfibios, está lo suficientemente alejado como para poder hacer comparaciones. Los marsupiales, por el contrario, se encuentran tan próximos que las diferencias en las primeras fases del desarrollo son menores (Selwood y Johnson, 2006), mientras que los monotremas son de difícil acceso para la investigación. Además, la estructura general del embrión del pollo en las fases iniciales de su desarrollo es sumamente atractiva en el contexto del estudio del origen evolutivo del blastocisto del ratón. En el momento de la puesta contamos con un embrión que de forma similar al blastocisto, se compondrá fundamentalmente de dos zonas que darán lugar al embrión en sí y a la mayor parte de los tejidos extraembrionarios respectivamente.

Pero el pollo no sólo es útil como modelo para profundizar en los eventos morfogenéticos que ocurren en desarrollo. Además, la secuenciación de su genoma ha supuesto también una puerta abierta a nuevas investigaciones. Una de las posibilidades más atrayentes que ofrece es el encontrar posibles elementos reguladores, dada su posición única en la evolución y lo compacto de su genoma.

Tras su secuenciación en los últimos años, se sabe que el genoma del pollo está comprimido al 40% con respecto al de humano y ratón. Su posición en la evolución en relación a otros vertebrados le convierte en una herramienta ideal en la búsqueda de secuencias conservadas no codificantes. Se cree que los linajes de las aves y los mamíferos divergieron hace 300 millones de años. Por eso, el pollo llena el vacío que quedaba entre los genomas de mamíferos secuenciados hasta ahora (como por ejemplo el humano, chimpancé, ratón o rata) y los de los demás vertebrados (como el pez globo, el pez cebra o la rana; Stern, 2005).

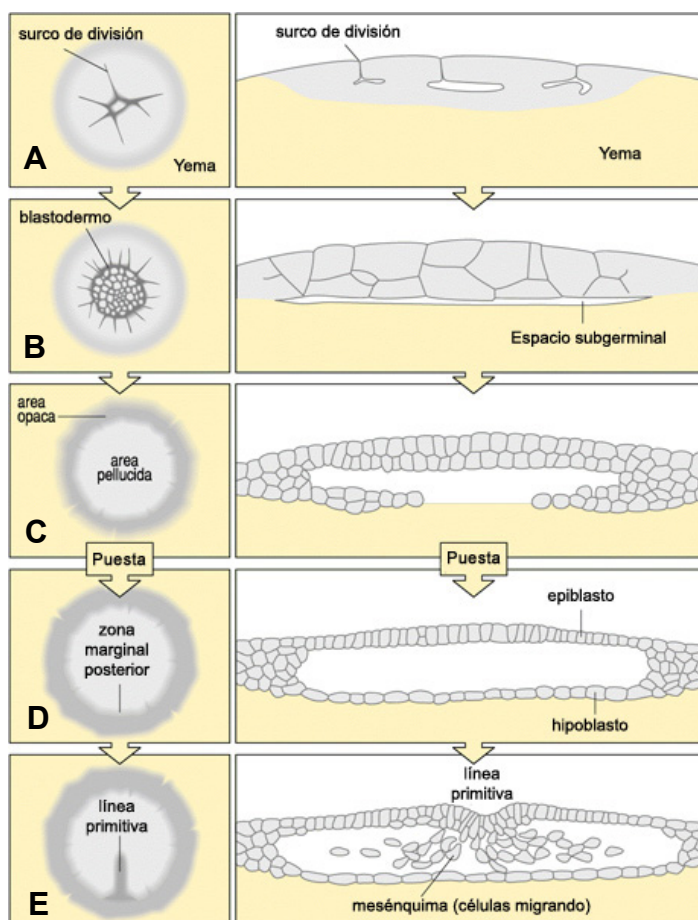
El genoma del pollo, al contrario de los peces teleósteos y muchos anfibios anuros, no ha sufrido recientemente una duplicación. Esto hace que en muchos de los casos haya una correspondencia 1:1 entre genes homólogos de aves y de mamíferos. Y lo más interesante, esto incluiría también a las regiones intrónicas no codificantes y flanqueantes de estos genes, que probablemente contienen elementos reguladores. Se estima que al menos 70 megabases de la secuencia del genoma del pollo podría codificar elementos conservados funcionales. Además, hay grandes bloques de sintenia entre el pollo y los mamíferos y una tasa relativamente baja de traslocaciones genómicas (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004).

Por lo tanto, el pollo es un modelo ideal, no sólo desde el punto de vista de la embriología, sino también como herramienta en los estudios de regulación de la expresión genética que llevaremos a cabo en este trabajo.

### 3.5.1 Primeras divisiones:

En el pollo, la fertilización tiene lugar en el infundíbulo del oviducto (Wishart y Horrocks, 2000). Incluso antes de la ovulación, el citoplasma del huevo ya se ha situado en la parte superior de la yema. Éste será el polo animal del embrión y se conoce como disco germinal, en el que también hay un cuerpo polar descartado tras la meiosis como ocurre en el oocito del ratón.

A medida que la yema, envuelta en una membrana vitelina, desciende girando por el oviducto, se va envolviendo progresivamente en un sistema de membranas que acabarán formando la cáscara del huevo. Durante este tiempo, el embrión empieza a sufrir las primeras divisiones, siguiendo un patrón diferente al del embrión del ratón. En estas primeras fases (16 células) se producen divisiones asimétricas que dan como resultado una célula completamente cerrada y una célula abierta. Alrededor del estadio de 64 células, todas las células situadas en la parte central están totalmente envueltas por una membrana cerrada. A lo largo de estas fases, se empieza a bombear líquido a través de la membrana vitelina que envuelve al embrión para acumularse formando la cavidad subgerminal por debajo del embrión (Fig. 6A, B).

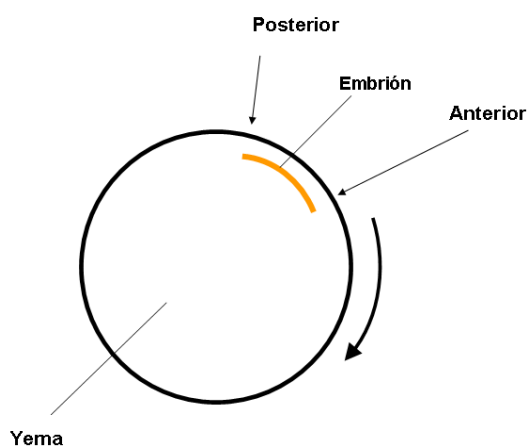


**Figura 6:** Esquema de las primeras etapas del desarrollo del pollo, en torno al momento de la puesta. **A, B,** inicialmente, se generan un grupo de células que ocupan la parte central del blastodisco mediante sucesivas divisiones; estas células constituirán el área pellúcida. **C,** posteriormente, las divisiones se producen también en la parte periférica dando lugar a las células del área opaca. Una vez que esto ha ocurrido, las células dejan una cavidad en la parte inferior conocida como espacio subgerminal. **D,** en el momento de la puesta, las células que han migrado desde la parte posterior del área opaca constituyen la monocapa del hipoblasto. En la parte superior se halla el epiblasto. **E,** posteriormente, comienza la ingresión de las células del epiblasto que formarán la línea primitiva, lo que supone el inicio de la gastrulación. Modificado de Wolpert (2002).

### 3.5.2 Especificación de los ejes corporales y gastrulación:

El evento más importante que tiene lugar en estas fases del desarrollo es la especificación de los ejes dorsoventral y anteroposterior del futuro embrión. Durante estos estadios, la superficie inferior del embrión se asienta sobre la yema y se convierte así en la parte ventral mientras que en la parte superior, las células que están en contacto con la membrana vitelina constituirán la porción dorsal del embrión.

Entre 12 y 14 horas tras la fertilización, en el estadio VII de EGK, una parte del blastodermo aparece más transparente como consecuencia del desprendimiento de células. En estos momentos el huevo está descendiendo por el útero y con el giro, el extremo más ligero del blastodermo, la parte en la que las células se desprenden, queda más arriba y se convertirá en el futuro polo posterior del embrión (Fig. 7).



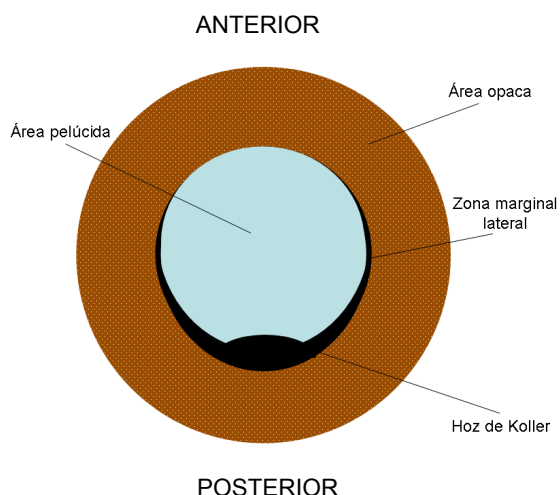
**Figura 7:** Representación esquemática de la rotación de la yema del huevo de pollo en su descenso por el útero materno. A medida que se produce el giro, el blastodermo tiende a recuperar su posición. La parte más ligera queda en la parte superior, que será el polo posterior del embrión.

En las horas siguientes, esta parte más transparente se expande aún más convirtiéndose en la llamada área pelúcida. Por el contrario, la zona periférica que la rodea no sufre ningún cambio y permanece más oscura. Ésta será el área opaca (Fig. 6C).

Después de 20 horas, en el estadio X EGK, se produce la puesta. En este momento el embrión cuenta con un área pelúcida central rodeada del área opaca. La parte dorsal del área pelúcida será el epiblasto, mientras que en la parte ventral se observan grupos de células que han ingresado y que constituirán el hipoblasto primario (Fig. 6D). Más adelante, el área pelúcida dará lugar al embrión propiamente dicho y a una pequeña parte de los tejidos extraembrionarios, mientras que el área opaca dará lugar únicamente a la mayor parte de los tejidos extraembrionarios. Esta estructura recuerda al embrión del ratón antes de la implantación. En ambos casos, nos hayamos ante los tres primeros linajes que están destinados tanto a generar un embrión, como todo el sistema de membranas externas dedicadas a la nutrición y el soporte.

En el estadio siguiente (XI), aparece un límite entre el área opaca y el área pelúcida denominada zona marginal, cuya parte posterior se denomina hoz de Köller (Fig. 8). A partir de

este momento comienzan en esta región los movimientos de ingresión de las células que dan lugar al inicio de la gastrulación (Fig. 6E).

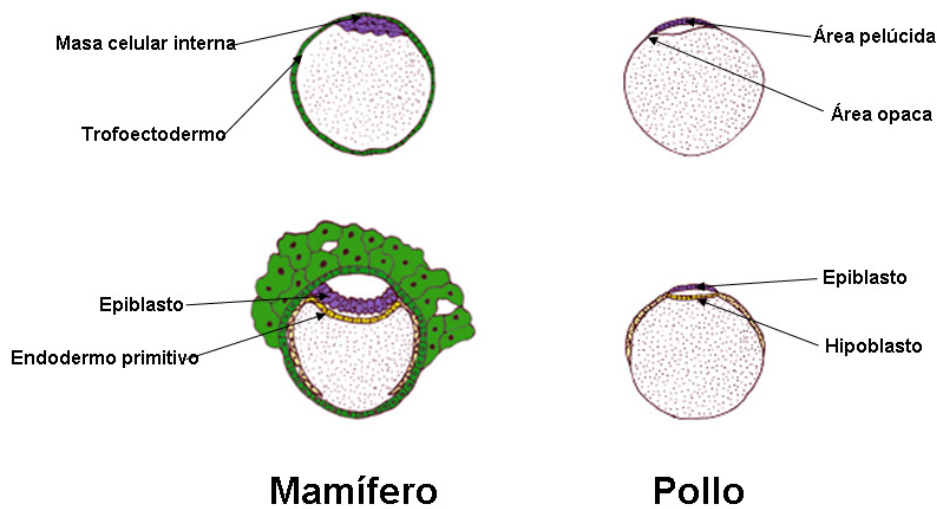


**Figura 8:** El esquema representa la superficie inferior de un embrión de pollo sin incubar. Se pueden apreciar principalmente dos tejidos bien diferenciados: el área opaca, más periférica, que dará lugar a la mayor parte de los tejidos extraembrionarios, y el área pelúcida, en la parte central, que dará lugar al embrión propiamente dicho. En negro se representa la zona marginal, en cuya parte posterior se localiza la hoz de Koller.

Como parte de nuestro trabajo, estudiaremos por tanto el patrón de expresión del gen *Cdx2* en estos momentos del desarrollo del pollo. Esto nos permitirá conocer mejor tanto la evolución de este gen como de los linajes que componen el embrión temprano y su especificación.

### 3.5.3 ¿Nos ayuda el pollo a conocer la evolución del blastocisto?

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, podemos afirmar que tanto estructural como funcionalmente, el embrión del pollo en el momento de la puesta (EGK X) guarda ciertas similitudes con el blastocisto del ratón. Si observamos el embrión del pollo en este estadio, nos encontramos con un grupo central de células que a su vez se subdivide en un epiblasto y un hipoblasto. De la misma manera, el epiblasto dará lugar al embrión propiamente dicho mientras que el hipoblasto será reemplazado por un verdadero endodermo al comienzo de la gastrulación tal como ocurre en el ratón (Fig. 9). Por otra parte, esta estructura central se rodea de una capa periférica de células denominada área opaca que originará la mayor parte de los tejidos extraembrionarios (Callebaut, 2005).



**Figura 9:** Comparación del desarrollo temprano de los mamíferos y el pollo. Como se puede apreciar, hay semejanzas entre los estadios de pregastrulación (fila inferior) en ambos grupos. Las células del epiblasto de los mamíferos (azul) comenzarán la gastrulación ingresando entre el epiblasto y el hipoblasto (amarillo). De igual forma, las células del epiblasto del pollo (azul) migrarán a través del espacio entre el epiblasto y el hipoblasto (amarillo). El espacio virtual por donde migran las células en el mamífero es, por tanto, equivalente a la cavidad del blastocelo en el pollo, pero no se denomina de esta forma. Por el contrario, el blastocelo en mamíferos sería la cavidad (colapsada) que se encuentra bajo el epiblasto, que desde este punto de vista habría recibido un nombre erróneo. Este "error" provendría de comparar el blastocisto de los mamíferos (parte superior izquierda) con el embrión del pollo en estadio de pregastrulación (parte inferior derecha). Se puede establecer de la misma manera un paralelismo entre la migración de las células del endodermo primitivo de mamíferos alrededor de la vesícula del vitelo y las células del hipoblasto del pollo alrededor de la yema para formar en ambos casos el saco vitelino. Modificado de (O'Farrell et al., 2004).

Son, por tanto, muchas las similitudes que guardan el blastocisto del ratón y la "blástula" del pollo. En otros estudios siempre se intentó buscar puntos en común entre el desarrollo del ratón y el de otros animales comparando las divisiones que acontecen tras la fertilización. Sin embargo, es más probable que las divisiones tempranas que ocurren en otras especies tras la fertilización sean más bien equiparables a aquellas que ocurren más tarde, ya próximas a la gastrulación en el ratón. Esto quiere decir que cuando pensamos en el desarrollo temprano del ratón, las diferencias que observamos en las primeras divisiones se deberían a diferencias simplemente temporales. Dicho de otra forma, el sistema de división y la generación de asimetría en el embrión del ratón sería similar al de otras especies, sólo hay que ir a buscarlo más tarde, después del periodo que se interpone tras la fertilización (O'Farrell et al., 2004).

El objetivo central de este trabajo es comprender el origen evolutivo y las redes génicas de regulación implicadas en estas primeras fases del desarrollo del embrión de los mamíferos, y así desentrañar los mecanismos que generan la estructura única que es el blastocisto.

## 4 Objetivos





1. **Conocer el momento en el que se especifican los dos primeros linajes del embrión del ratón, que serán el trofoectodermo y la masa celular interna del blastocisto.**

Esto implica la puesta a punto de un sistema de trazado mediante la utilización de dos cepas de ratón genéticamente modificadas y la administración de tamoxifeno en embriones durante las primeras divisiones del desarrollo.

2. **Estudiar el mecanismo de regulación de la expresión del gen *Cdx2* en el embrión del ratón, por su relevancia en los fenómenos de especificación del trofoectodermo, frente al linaje de la masa celular interna.**

Para desarrollar este objetivo se comprobará experimentalmente la capacidad para dirigir la expresión génica de secuencias candidatas de DNA mediante la generación de embriones transgénicos por microinyección pronuclear de oocitos fertilizados de ratón.

3. **Profundizar en el origen evolutivo del blastocisto del ratón, comparándolo con el desarrollo temprano del embrión del pollo.**

Para tal fin, se comparará el patrón de expresión de *Cdx2* en el embrión temprano del pollo con el que se ha descrito para el ratón.



## 5 Materiales y Métodos



## 5.1 Cepas de ratón:

Para la obtención de oocitos para la generación de embriones transgénicos se cruzaron machos de la cepa CBA con hembras de la cepa C57/BL6 y se emplearon los individuos de la F1 tanto para obtener oocitos fertilizados como hembras pseudo-gestantes y machos enteros y vasectomizados.

La cepa RERT fue aportada generosamente por el Dr. Mariano Barbacid (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO) y tiene una inserción del cDNA de la recombinasa CreERT2 en la UTR 3' del gen de la subunidad principal de la RNA polimerasa II (Guerra et al., 2003; Brocard et al., 1997).

La cepa R26R-LacZ contiene un *cassette* de resistencia a neomicina seguido de tres señales de poliadenilación y flanqueado por dos sitios lox-P, todo ello seguido por el gen de la  $\beta$ -galactosidasa, y precedido de un aceptor de *splicing*, insertado mediante recombinación homóloga en el locus ROSA26 (Soriano, 1999).

Estas dos líneas se cruzaron y los ratones obtenidos se cruzaron a su vez para mantener las dos modificaciones en homocigosis en una misma línea.

## 5.2 Análisis de secuencias:

La caracterización de potenciales elementos de regulación en cis de la transcripción se realizó mediante la identificación de secuencias genómicas no-codificantes conservadas evolutivamente, lo que se conoce como *footprinting* filogenético (Lenhard et al., 2003; Zhang y Gerstein, 2003). Este abordaje parte de la base de que las secuencias conservadas en la evolución deben de albergar alguna función, ya que de lo contrario se habrían perdido.

Con objeto de estandarizar los estudios propuestos en este trabajo, se asumió el intervalo entre los genes vecinos en 5' y 3' del gen de interés como la región genómica a analizar.

Los fragmentos genómicos seleccionados de varias especies se descargaron del servidor de Internet ensembl (<http://www.ensembl.org>; Hubbard et al., 2007), donde se localizaron utilizando la herramienta de alineamiento BLAST, integrada en la interfaz web. Posteriormente se alinearon empleando los programas de alineamiento múltiple VISTA (<http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2>), que lleva a cabo un alineamiento global (Frazer et al., 2004) y PIPmaker (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker>), que genera un alineamiento local (Schwartz et al., 2000). Para comprobar estos resultados se empleó el servidor DCODE (<http://ecrbrowser.dcode.org/>), que contiene alineamientos precomputados generados mediante el programa MULAN (Ovcharenko et al., 2005). El archivo de anotación de los sitios de unión de la proteína CTCF en el genoma humano fue obtenido de José Luis Gómez-Skarmeta e Ivan Ovcharenko.

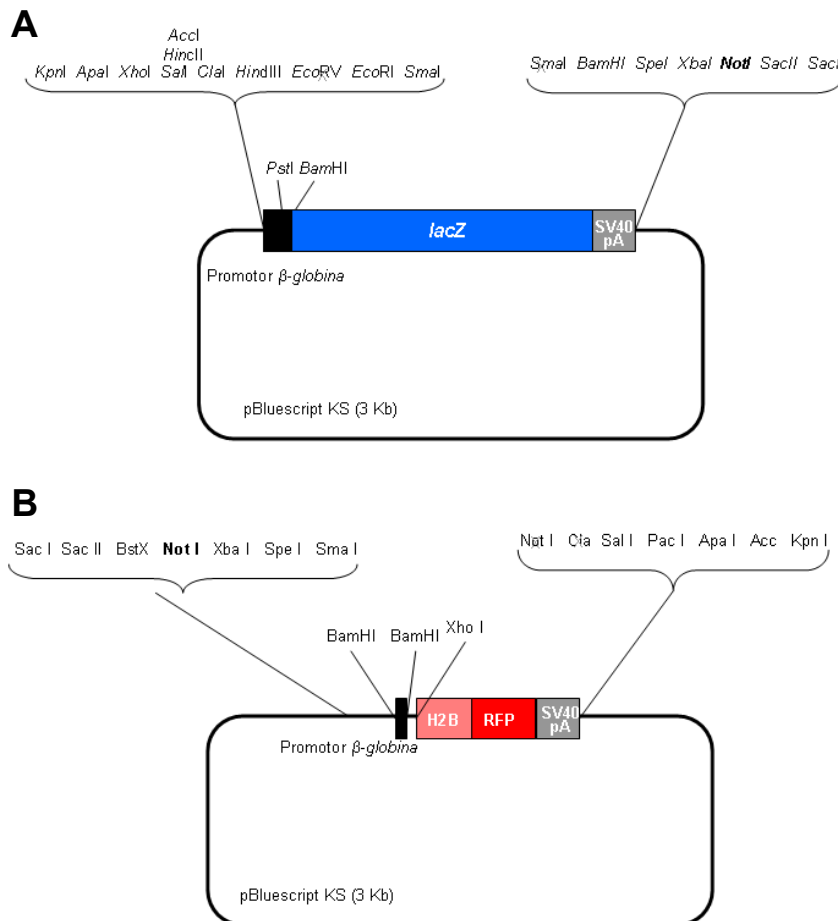
Los resultados obtenidos se analizaron para la elección de regiones candidatas. Éstas se seleccionaron englobando una o varias de las regiones conservadas, dependiendo de su distancia, y tomando como máximo fragmentos de 8-10 kb. Todas las secuencias se compararon con distintas bases de datos para descartar que correspondieran a zonas transcritas no anotadas como tales o a elementos repetidos.

### 5.3 Generación de construcciones:

Las regiones genómicas seleccionadas por *footprinting* filogenético se amplificaron mediante PCR a partir del clon BAC RP245I065. Dado que algunos de los fragmentos eran mayores de 2Kb, se emplearon protocolos y kits comerciales para PCR de larga distancia (Sambrook y Russell, 2001). Como control positivo se usó un *enhancer* distal de Oct4 (Yeom et al., 1996) que se amplificó por PCR usando como molde el clon genómico BAC RP23-152G18. Ambos clones se obtuvieron a través del Children's Hospital Oakland Research Institute y provienen de la cepa de ratón C57/BL6. Los oligos utilizados fueron los siguientes:

Fragmento	Oligos	longitud
1	AGCGGCCGCACCAAGGAAGGGTGTTCAGTC (d) AGCGGCCGCTTGACCTGGGGTGAGTACA (r)	500 pb
2	AGCGGCCGCAGTTGGAGAGGTCTCACATCAAA (d) AGCGGCCGCATGTCCGGATGTGTATAGGAGTG (r)	1,5 Kpb
3	AGCGGCCGCAGTTGGAGAGGTCTCACATCAAA (d) AGCGGCCGCCAGATTTGGTTCTGTCTGTTCTG (r)	500 pb
4	AGCGGCCGCTCCATTATTCGCTCTAAACAGC (d) AGCGGCCGCCGAGTCACTGATCTGTGTAACGA	1,6 Kpb
5	GCTGTTTGGAGAGAAGAAAGGAG (d) CTGATCTTCTTCA CTTCACCCAG (r)	5 Kpb
Oct4- DE	AGCGGCCGCCTCTGCTACATGTAAATTTGTCT (d) AGCGGCCGCCTAAACAGGTAACAACCTTGAA (r)	3,3 Kpb

Los fragmentos genómicos amplificados se clonaron o bien directamente, o bien a través de un paso previo de clonaje de los productos de PCR en vectores de clonaje por T-terminal ("T-end cloning"; Sambrook y Russell, 2001), en dos vectores diferentes diseñados específicamente para la detección de elementos reguladores de la transcripción (*enhancers*) por medio de transgénesis en ratón. El primero de ellos (regalo del Dr. Robb Krumlauf, *Stowers Institute*, Kansas, EEUU) contiene el promotor mínimo de la  $\beta$ -globina humana, el gen marcador *lacZ*, y una señal de poli-adenilación de SV40 (Yee y Rigby, 1993; Fig. 10A); el segundo vector posee una estructura similar, diferenciándose sólo en la presencia de un gen marcador diferente: el de la proteína fluorescente roja (mRFP-1) fusionada a la histona H2B que hace que la proteína se localice en el núcleo (regalo de la Dra. Janet Rossant, *Hospital for the Sick Children*, Toronto, Canadá; Fig. 10B). Ambos vectores se generaron a partir de un pBlueScript.



**Figura 10:** Vectores utilizados en los experimentos de microinyección. **A**, este vector contiene un promotor basal de  $\beta$ -globina humana y un gen marcador *lacZ* seguido de una señal de poliadenilación. **B**, este vector contiene un promotor basal de  $\beta$ -globina humana y un gen marcador mRFP-1 fusionado con una histona H2B, seguido de una señal de poliadenilación. Los fragmentos cuya capacidad reguladora se quería comprobar, así como el que se utilizó como control positivo se clonaron en el sitio *NotI*, marcado en negrita en ambos casos. A continuación, se extrajo este fragmento junto con el promotor y el gen marcador para su microinyección mediante digestiones en los sitios únicos *Sal I* y *SacII*.

## 5.4 Obtención y cultivo de los embriones de ratón:

Las hembras F1 súper ovuladas se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los oviductos para obtener los embriones en el estadio E0.5. Éstos se limpiaron en medio M2 (Sigma), al que se añadió hialuronidasa (Sigma) a una concentración de 300  $\mu\text{g/ml}$  para eliminar las células del cúmulo que rodean al oocito y se encuentran normalmente adheridas a la zona pelúcida. A continuación se cultivaron en medio M16 (Sigma) en un incubador a 37°C de temperatura y una concentración del 5% de  $\text{CO}_2$  durante 4 días hasta alcanzar el estadio de blastocisto (E4.5).

Para obtener embriones en estadio de post-implantación, los oocitos microinyectados o bien los embriones de dos células tratados con tamoxifeno fueron transferidos a hembras pseudogestantes. En todos los casos, las transferencias fueron realizadas por la Dra. M. Eva Alonso Fernández. Tras el número de días necesario para alcanzar el estadio del desarrollo deseado, las hembras fueron sacrificadas, se extrajeron los embriones del útero y fueron procesados para la detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.



## **5.5 Administración del tamoxifeno:**

Para la administración de tamoxifeno se expuso a los embriones en estadio de una, dos y cuatro células en cultivo a una concentración específica de esta molécula durante varias horas en medio M16. Tras el tiempo del tratamiento, se lavaron los embriones pasándolos por varias gotas de medio M16 sin tamoxifeno y se continuó su cultivo en medio M16. A continuación se dejó a los embriones progresar hasta E4.5 en el incubador o bien se transfirieron a hembras pseudogestantes en función del tipo de diseño experimental. Las transferencias se llevaron a cabo siguiendo protocolos establecidos (Nagy et al., 2003). En este último caso se dejó a los embriones transferidos progresar hasta el estadio E7.5 y hasta E14.5, cuando fueron recuperados para su posterior análisis. Tanto los blastocistos como los embriones se procesaron para la detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

## **5.6 Generación y análisis de embriones transgénicos de ratón:**

Los embriones transgénicos se generaron por microinyección pronuclear de embriones en estadio E0.5. Para cada sesión de microinyección se superovularon 12 hembras que se cruzaron con 12 machos F1 siguiendo protocolos establecidos (Nagy et al., 2003). Tras sacrificar a las hembras se obtuvieron en promedio 200 oocitos fertilizados, que se microinyectaron durante la primera mitad del primer día de desarrollo. Para ello se empleó un microscopio invertido Leica DMIRE2 con micromanipuladores automáticos Eppendorf. Se emplearon agujas de microinyección comerciales de 0,5  $\mu$ m de diámetro (Femtotip II, Eppendorf) y capilares de sujeción de 15  $\mu$ m de diámetro (Laboratoire CCD). Las construcciones se microinyectaron linearizadas, tras eliminar la secuencia del plásmido, a una concentración de 5 ng/ $\mu$ l en buffer de microinyección, que se compone de Tris HCl pH 7,4 a una concentración de 50 mM, EDTA 1 mM y H<sub>2</sub>O. Previamente se purificaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma), mediante el uso de la enzima Gelasa (Epicentre). Además, antes de preparar la solución de microinyección se filtraron utilizando columnas comerciales (Amicon Ultrafree-MC).

Después de la microinyección, los embriones se cultivaron durante los cuatro días siguientes a 37°C de temperatura y una concentración de CO<sub>2</sub> del 5% hasta que alcanzaron el estadio de blastocisto expandido. La actividad del elemento regulador se detectó mediante la tinción de *lacZ*, y su observación en un microscopio confocal.

### 5.7 Detección de la actividad $\beta$ -galactosidasa:

Los embriones en estadios de preimplantación se fijaron durante 5 minutos en una mezcla de formaldehído al 1%, glutaraldehído al 0,2%, EGTA 5mM y  $MgCl_2$  2mM en tampón fosfato salino (PBS) con 0,02% de Igepal. Para los estadios embrionarios de post implantación se escogieron tiempos de fijación superiores, de 30 minutos. A continuación se lavaron tres veces en PBS con Igepal. Por último se tiñeron en la solución de revelado de  $\beta$ -galactosidasa, que contiene  $K_3Fe$  a una concentración de 5mM,  $K_4Fe$  5mM,  $MgCl_2$  2mM y X-Gal a 1mg/ml en PBS con Igepal en oscuridad hasta que aparece el color azul. Posteriormente, se lavaron con PBS con Igepal para eliminar la solución de revelado.

### 5.8 Hibridación *in situ* en embriones de pollo:

Para las hibridaciones *in situ* se generó una sonda a partir de un cDNA de *Cdx2* de pollo, que se identificó mediante el navegador genómico ensembl (Hubbard et al., 2007), rastreando bibliotecas públicas de ESTs (*expressed sequenced tag*; Boardman et al., 2002) y obteniendo el clon correspondiente de distribuidores comerciales. Concretamente, se utilizó el clon ChEST626o23 (clone location Chicken\_0626o23).

Este clon de cDNA se empleó para generar ribo-sondas marcadas con digoxigenina para la detección de la expresión en embriones enteros siguiendo protocolos establecidos. En todos los casos se generaron sondas tanto en el sentido contrario a la transcripción (experimental) como en el mismo sentido (control negativo).

Los huevos fertilizados de gallina se obtuvieron de una granja comercial (Granja Santa Isabel, Córdoba). Se recibieron después de la puesta y se extrajeron inmediatamente los embriones para obtener los estadios EGK X, XI. Para obtener estadios posteriores se incubaron en el laboratorio a 37°C durante el tiempo necesario de acuerdo con la tabla normal del desarrollo de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1992).

Los embriones se fijaron en paraformaldehído al 4%, se lavaron en PBS y se prehibridaron durante una hora a 70°C. Después, se hibridaron con la sonda sentido o antisentido durante una noche a la misma temperatura. Tras lavar los embriones, la hibridación específica de la sonda se visualizó mediante anticuerpos anti-digoxigenina acoplados a fosfatasa alcalina. Finalmente, se empleó NBT/BCIP (Roche) como sustrato de esta enzima, que produce un precipitado de color azul y permite así visualizar la sonda (Ariza-McNaughton y Krumlauf, 2002; Nieto et al., 1996).

## **5.9 Visualización de embriones y procesamiento de imágenes:**

La visualización de los blastocistos teñidos para  $\beta$ -galactosidasa se llevó a cabo mediante un microscopio invertido Leica DMIRE2. Los blastocistos transgénicos para el gen RFP se visualizaron en un microscopio confocal Leica SP5. Los embriones de ratón de estadios de postimplantación y de pollo teñidos para  $\beta$ -galactosidasa se observaron mediante una lupa Leica MZ16. Todas las imágenes se capturaron mediante cámaras digitales acopladas a los microscopios y las lupas y se procesaron mediante Adobe PhotoShop 7.0.

## 6 Resultados



## **6.1 Estudios de trazado genético de linaje en el embrión de ratón en estadios de preimplantación:**

Para llevar a cabo los estudios de linaje en el embrión del ratón se usó una estrategia genética basada en la recombinasa específica de sitio Cre (Sauer y Henderson, 1988). Como resultado de la acción de esta enzima se elimina un *cassette* que de otra forma impide la transcripción de un gen marcador *lacZ*. Una vez que esto ocurre *lacZ* se expresa constitutiva e independientemente del tipo celular debido a la acción del promotor ROSA26.

La enzima utilizada es una recombinasa CreERT2, que es inducible por tamoxifeno (Feil et al., 1997). Así, la expresión ubicua de CreERT2 se consigue mediante la inserción del cDNA de CreERT2 en la región UTR3' de la RNA polimerasa II (Guerra et al., 2003). CreERT2 es una proteína quimérica donde la recombinasa Cre está fusionada al dominio de unión al ligando (LBD) del receptor de estrógenos. Mediante la modificación del LBD se obtiene el dominio ERT2 (Feil et al., 1997; Imai et al., 2001; Indra et al., 1999; Kimmel et al., 2000), que contiene las mutaciones G400V/M543A/L544A. Este dominio tiene muy baja afinidad por su ligando natural, el  $\beta$ -estradiol, y gran afinidad por el análogo de estrógenos 4-hidroxitamoxifeno.

En condiciones normales el receptor de estrógenos se encuentra secuestrado en el citoplasma, unido al citoesqueleto a través de la chaperona hsp90. Tras la unión del tamoxifeno, el receptor queda liberado y puede viajar al interior del núcleo, con lo que Cre que está fusionada a él puede acceder a los sitios loxP y recombinar esta región. Como resultado se elimina el *cassette* que impedía la transcripción de *lacZ*, que ahora se expresará fuertemente como consecuencia de la acción del promotor ROSA26.

### **6.1.1 Puesta a punto del sistema de trazado de linaje:**

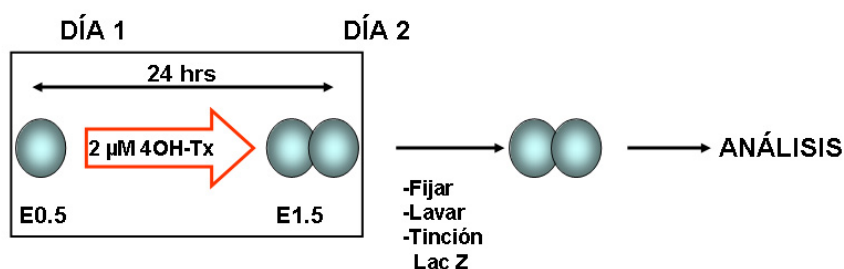
Antes de comenzar estos experimentos fue necesario poner a punto la técnica de trazado que íbamos a emplear en nuestros ensayos, ya que se iba a realizar este tipo de trabajo por primera vez con embriones en cultivo. Se requería encontrar las condiciones óptimas para producir el marcaje de una sola célula, y así poder asumir que las células que aparecen teñidas en estadios posteriores son descendientes de esa célula marcada. A la hora de diseñar los experimentos contamos con diferentes variables sobre las que podemos intervenir, como son el estadio concreto del desarrollo, el tiempo de administración o la concentración del tamoxifeno (Arques et al., 2007).

Inicialmente se llevaron a cabo experimentos en los que se estudió la viabilidad de los embriones expuestos a diferentes concentraciones de tamoxifeno. Se administró tamoxifeno a los embriones de una célula y se comprobó el número de embriones que alcanzan el estadio de dos células al cabo de 24 horas. En estas pruebas se intentó llegar a la concentración óptima en la que la viabilidad no está afectada por la presencia del tamoxifeno. Así, se incrementaron las concentraciones desde 0,2  $\mu$ molar. A esta concentración inicial los 40 embriones tratados sobrevivieron.

A continuación se probó una concentración de 1  $\mu$ molar en 80 embriones de dos células y se les dejó progresar. De los 80 embriones, 71 alcanzaron el estadio de cuatro células. En el siguiente experimento se incrementó la concentración a 2  $\mu$ molar, se trataron 50 embriones de dos células, de los que 48 alcanzaron el estadio de cuatro células. Cuando se incrementó la concentración de tamoxifeno a 5  $\mu$ molar y se trataron 40 embriones de dos células, ninguno de ellos sobrevivió. Por tanto, la concentración superior a la que los embriones eran viables fue de 2  $\mu$ molar.

El paso siguiente fue comprobar que podemos marcar una sola célula y la funcionalidad del sistema en los estadios en los que estamos interesados, porque se necesita acotar la ventana de tiempo en la que administraremos el tamoxifeno. Para comenzar, hicimos experimentos en los que se administró el tamoxifeno a una concentración de 2  $\mu$ molar a 40 embriones de una célula durante toda una noche, se les dejó progresar hasta el estadio de dos células y en este punto fueron teñidos para  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 11). Al hacer este tipo de ensayo esperaríamos que no hubiera marcaje en dos células ya que se ha descrito previamente que el tamoxifeno se inactiva 6 horas después de su administración (Robinson et al., 1991) y la transcripción cigótica no comienza hasta las últimas horas del estadio de una célula, previamente a la primera división mitótica (Schultz, 2002). Además, es necesario que se fusionen los pronúcleos masculino y femenino, lo cuál también restringe el tiempo en el que el tratamiento puede ser efectivo. En consonancia con nuestras expectativas, en estos experimentos no se observó marcaje en ninguna de las dos células.

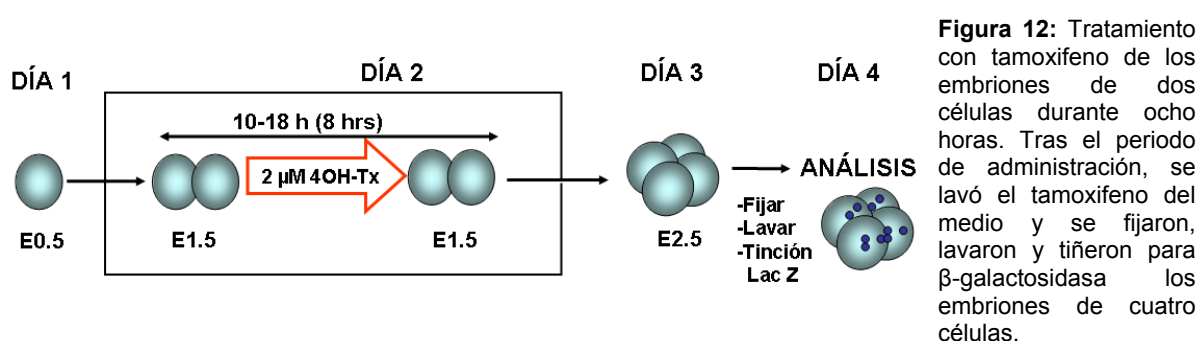
Para conocer el tiempo necesario para que este mecanismo funcione a nivel molecular, llevamos a cabo otro grupo de experimentos. En este segundo caso, administramos el tamoxifeno a embriones de dos células durante la primera parte del segundo día de desarrollo y llevamos a cabo la tinción al final del día, todavía en estadio de dos células. En este caso no observamos marcaje en los embriones. Esto probablemente quiere decir que para que el mecanismo se active se requiere una división. Se podría interpretar como que la célula tendría que pasar por una ronda de replicación para que las modificaciones a nivel genético sean efectivas y se exprese el gen *lacZ* recombinado en el locus ROSA26.



**Figura 11:** Tratamiento con tamoxifeno de los embriones de una célula durante toda una noche. Tras el periodo de administración, se lavó el tamoxifeno del medio y se fijaron, lavaron y tiñeron para  $\beta$ -galactosidasa los embriones de dos células.

Para corroborar esta hipótesis se llevó a cabo el experimento en diferentes condiciones. Se trató a los embriones en dos células y se tiñeron para  $\beta$ -galactosidasa en el estadio de cuatro células. Inicialmente se realizaron experimentos en los que se administró el tamoxifeno durante 8 horas entre las 10 y las 18 horas del segundo día de desarrollo (Fig. 12), para después ensayar pulsos de tamoxifeno de 4 horas en dos condiciones diferentes: entre las 10 y las 14 horas o entre las 13 y las 17 horas (Fig. 13). Mediante estos tipos diferentes de tratamiento pretendíamos determinar al tiempo de administración ideal en el que obtuviéramos un solo evento de recombinación para marcar una sola célula.

Cuando se administró el tamoxifeno durante 8 horas en el estadio de 2 células se obtuvieron 8 embriones de cuatro células sin marcaje para un total de 22 embriones (37%), 6 embriones de cuatro células con dos células marcadas (27%) y 8 de cuatro células con 3 células marcadas (37%).



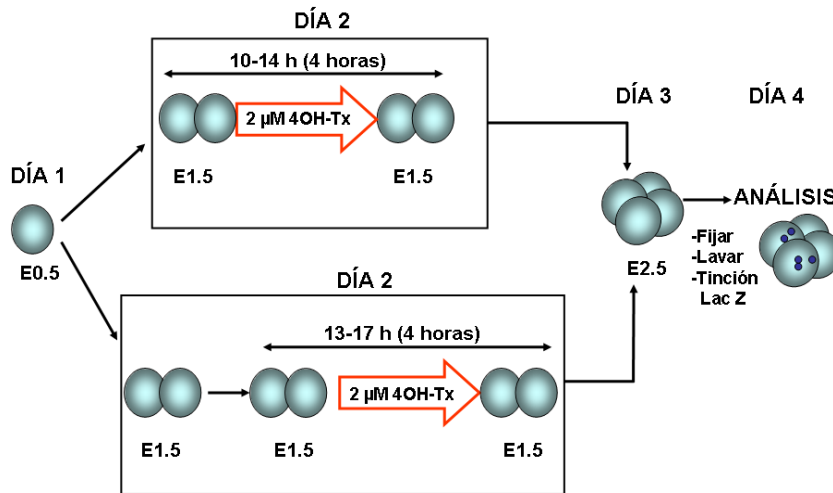
Al administrar el tamoxifeno durante 4 horas entre las 10 y las 14 horas en el segundo día de desarrollo, de 22 embriones tratados 16 no presentaban marcaje (73%) y se obtuvieron 6 embriones con dos células marcadas (27%; Fig. 14).

Por último, se administró el tamoxifeno durante 4 horas entre las 13 y las 17 horas (Fig. 13). En este caso, de 20 embriones tratados, se obtuvieron 8 sin marcaje (40%), se obtuvieron 4 embriones con una célula marcada (20%), se obtuvieron 5 embriones con dos células marcadas (25%) y 3 embriones en los que tres células aparecían marcadas (15%).

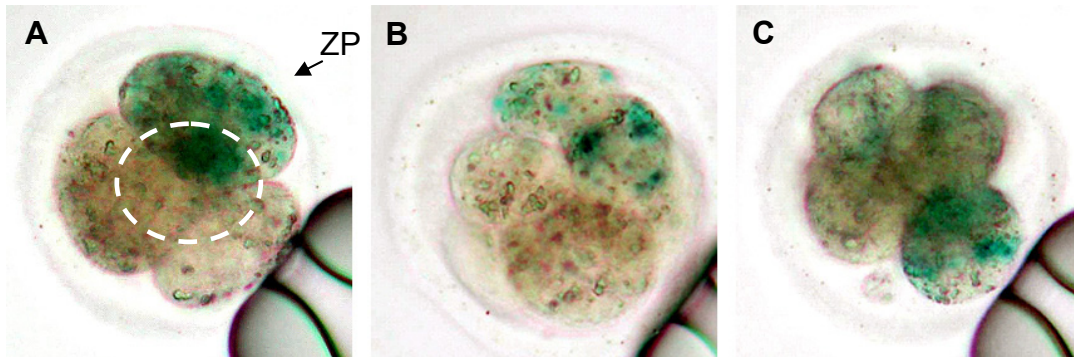
De estos resultados se desprenden dos conclusiones fundamentales. Primero, la ventana de tiempo escogida de 4 horas en la primera parte del segundo día de desarrollo del tratamiento con tamoxifeno resulta en una mayor parte de los embriones de cuatro células sin marcaje, más una pequeña proporción de ellos que presentan dos células marcadas. Es previsible que estas células marcadas procedan de la recombinación en un único blastómero del embrión de dos células. Segundo, las células que aparecen marcadas en el embrión de cuatro células se deberían al efecto del tamoxifeno administrado en el estadio de dos células, y no a fenómenos de recombinación posteriores. Como ya se comprobó previamente, podría ser que se requiera un ciclo de división del embrión para que el mecanismo genético funcione y podamos detectar marcaje al llevar a cabo la tinción para  $\beta$ -galactosidasa. Desde este punto de vista, parece poco probable que las células marcadas en el embrión de cuatro células provengan de una



actividad residual de Cre o del tamoxifeno que pudiera quedar en pequeñas cantidades en el medio de cultivo tras los lavados efectuados. Por ello, podemos afirmar que las condiciones óptimas de tratamiento de los embriones de dos células para marcar una sola serían un tiempo de 4 horas en la primera mitad del segundo día de desarrollo a una concentración de 2  $\mu$ M de tamoxifeno.



**Figura 13:** Tratamiento con tamoxifeno de los embriones en estadio de dos células durante la primera mitad o la segunda mitad del segundo día de desarrollo. Tras el tratamiento se eliminó el tamoxifeno del medio y se dejó progresar a los embriones en cultivo hasta el estadio de 4 células. En este momento se llevó a cabo la tinción para  $\beta$ -galactosidasa.

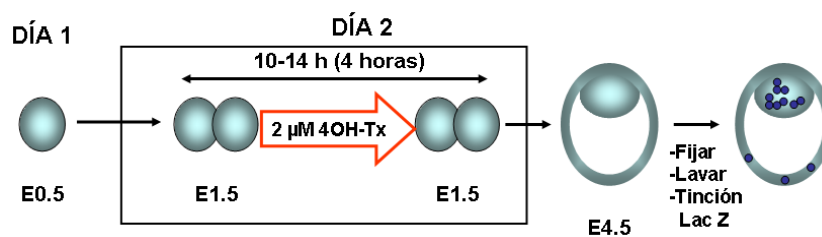


**Figura 14:** Diferentes tipos de marcaje obtenidos en embriones de cuatro células en los que se administró el tamoxifeno en el estadio de dos células. **A**, un embrión de cuatro células con dos células marcadas en el que una de ellas queda oculta en este plano (línea discontinua blanca). **B**, embrión de cuatro células en el que dos células aparecen marcadas. **C**, embrión de cuatro células en el que tres de ellas están teñidas. En la parte inferior derecha de cada fotografía aparece la pipeta de contención que se utiliza para manipular los blastocistos en el microscopio. ZP: Zona pelúcida.

### 6.1.2 Ensayos de marcaje de los blastómeros tempranos para conocer su descendencia:

El objetivo de los experimentos descritos en este apartado y en el siguiente es saber en qué momento las células del embrión temprano están ya determinadas para contribuir específicamente con su descendencia a partes concretas del blastocisto o incluso del embrión más tardío.

En primer lugar, intentamos responder a la pregunta de si la descendencia de los blastómeros que componen el embrión de dos células tiene ya un destino restringido. Para ello, se llevó a cabo un tratamiento en el que se utilizaron las condiciones optimizadas en los experimentos anteriores: una concentración de 2  $\mu$ molar y un pulso de tamoxifeno entre las 10 y las 14 horas del segundo día de desarrollo y después se dejó a los embriones progresar hasta estadio de blastocisto (Fig. 15). Cuando se tiñeron para  $\beta$ -galactosidasa los blastocistos, se obtuvo una colección de diferentes tipos de marcaje en algo menos de la mitad de los blastocistos totales, mientras que los restantes no presentaban marcaje alguno. Entre los blastocistos marcados, el 10% presentaban señal distribuida por todo el blastocisto, el 10% tenía señal sólo en el trofoectodermo, el 11% sólo en la masa celular interna y el 68% restante tenían parches distribuidos tanto en el trofoectodermo como en la masa celular interna (Tabla 1, Fig.17). En este último caso aproximadamente la mitad de ellos presentaban expresión de *lacZ* en igual medida en ambos tejidos.



**Figura 15:** Tratamiento de los embriones en estadio de dos células durante 4 horas en la primera mitad del segundo día de desarrollo. A continuación se limpió el tamoxifeno del medio y se dejó progresar en cultivo a los embriones hasta el estadio de blastocisto. En este momento fueron fijados y teñidos para  $\beta$ -galactosidasa.

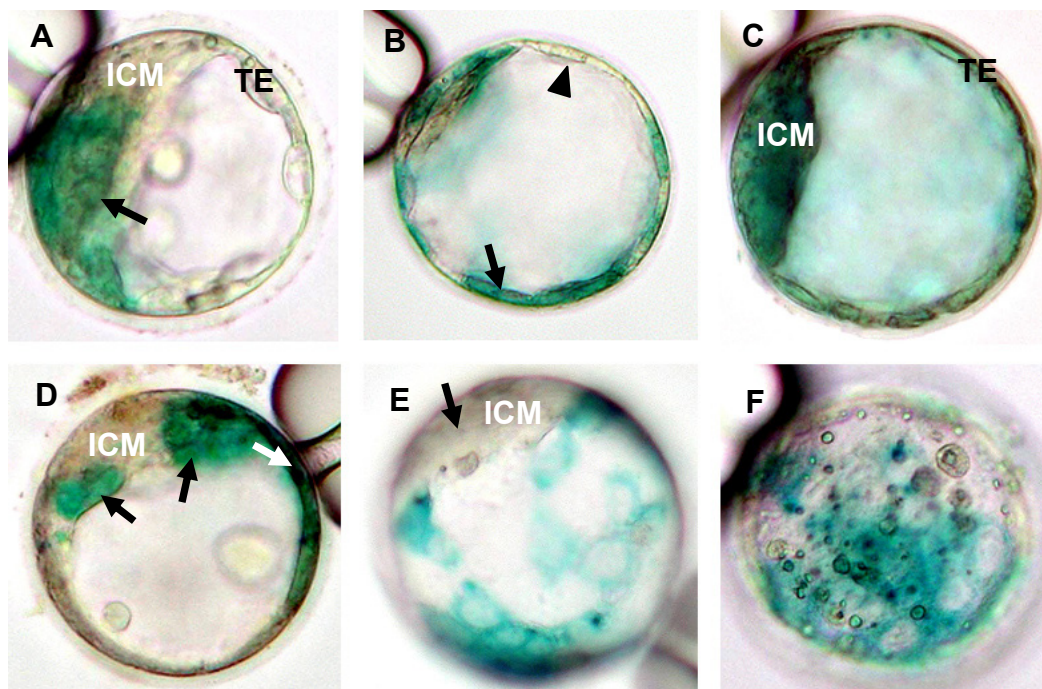
Observamos con cierta frecuencia blastocistos en los que el marcaje se da en un gran grupo de células, que parece restringirse a una mitad de la masa celular interna y se extiende hacia el trofoectodermo mural adyacente. Esto podría dar la impresión de que las células marcadas se restringen a una mitad del blastocisto, pero la observación en diferentes planos, así como desde diferentes puntos del blastocisto confirman que el marcaje se distribuye al azar y los grupos de células no están en una zona específica (Fig. 16A). De la misma manera, en blastocistos en los que el marcaje se concentra en células que parecen ocupar sólo el polo abembrionario, cuando los observamos desde diferentes perspectivas, podemos apreciar como los grupos de células marcadas se distribuyen en realidad más ampliamente (Fig. 16E). Otro caso llamativo es el de los blastocistos en los que aparecen grupos de células marcadas con gran intensidad que ocupan grandes extensiones y que se ubican en la masa celular interna. Estas células tienden a aparecer formando un continuo en el trofoectodermo adyacente, llegando a extenderse hasta el extremo opuesto del blastocisto a través del trofoectodermo mural (Fig. 16D). Asimismo, podemos encontrar en nuestros resultados blastocistos en los que apreciamos el marcaje en pequeños puntos, que solapan con grandes parches de menor intensidad, especialmente en las células del trofoectodermo (Fig. 16F). Dentro de los

blastocistos que aparecen parcialmente teñidos, podemos encontrar también algunos que presentan las células marcadas siguiendo una distribución homogénea tanto por todo el trofoectodermo como por la masa celular interna (Fig. 16B). Por último, cabe destacar el caso de los blastocistos en los que el marcaje se distribuye por toda su superficie de forma homogénea (Fig. 16C).

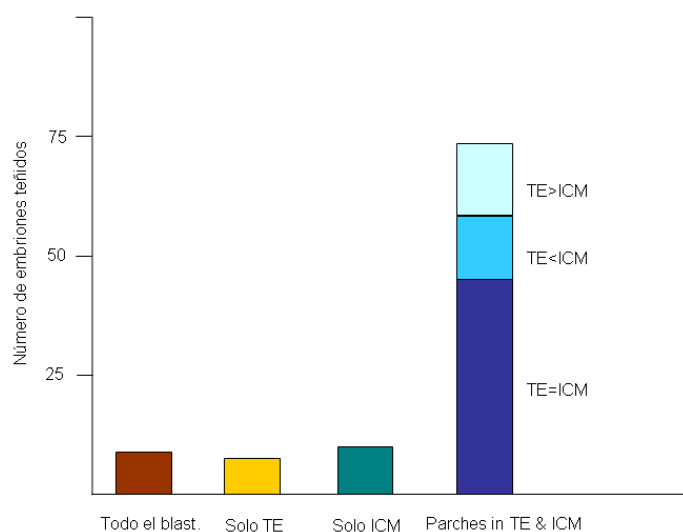
Teniendo en cuenta que el tratamiento está encaminado a marcar sólo una célula en el estadio de dos células, esperaríamos que los blastocistos aparecieran parcialmente marcados, como ocurre en la mayoría de los casos. Blastocistos sin marcaje significarían que no ha ocurrido recombinación mientras que blastocistos marcados en todas sus células querrán decir que la recombinación ha ocurrido en el estadio de dos células.

Cuando observamos nuestros resultados, hay que tener presente la posibilidad de que ocurra un evento de recombinación en una sola de las dos células del embrión en dos células, pero quede Cre residual que pudiera recombinar en el locus ROSA26 en estadios posteriores. Esto dificultaría la interpretación de los resultados, ya que podría resultar en blastocistos con más de la mitad de las células marcadas, debido a un primer evento de recombinación en el estadio de dos células y a un segundo evento en estadio de cuatro células o posterior. De manera análoga, también podría ocurrir que no hubiera recombinación en el estadio de dos células, y ocurriera posteriormente. Sin embargo, los resultados de los experimentos en los que se marcó en dos células y se reveló en cuatro parecen excluir esta posibilidad, ya que en las condiciones seleccionadas se obtienen dos células marcadas de las cuatro. Parecería poco probable que tras administrar tamoxifeno en el estadio de dos células no se produzca recombinación y que posteriormente, tras lavar el tamoxifeno, quedaran trazas de tamoxifeno o Cre activa que sí produzcan recombinación en el estadio siguiente. Por lo tanto, podemos afirmar que todo el marcaje observado es debido a la activación de Cre y recombinación en el estadio de dos células, mayoritariamente en una sola de las células y excepcionalmente en ambas (Fig. 16C, Fig. 17).

Estos resultados reflejan que la descendencia de los dos blastómeros del embrión de dos células no se restringe a una zona concreta del blastocisto. Por el contrario, la mayor parte de los blastocistos obtenidos muestran marcaje distribuido de forma aparentemente aleatoria por toda su extensión. No aparecen grupos de células que se concentren en el polo embrionario o abembrionario, ni tan siquiera en una zona específica o en uno de los dos tejidos que componen el blastocisto. Además, en muchos casos se observan células marcadas que se entremezclan con células no marcadas, sin formar grupos conectados entre sí. A continuación, decidimos llevar a cabo otro grupo de experimentos destinados a comprobar la distribución de los descendientes de estos blastómeros tempranos en estadios posteriores del desarrollo.



**Figura 16:** Blastocistos teñidos para revelar la actividad  $\beta$ -galactosidasa procedentes de embriones de dos células que fueron tratados con tamoxifeno durante la primera mitad del segundo día de desarrollo. **A.** blastocisto en el que se aprecia un gran parche que ocupa la mayor parte de la masa celular interna (flecha) y se extiende hacia el trofoectodermo mural. **B.** marcaje en forma de parches distribuidos por todo el blastocisto. Células marcadas (flecha) y sin marcaje (punta de flecha) en el trofoectodermo. **C.** blastocisto totalmente teñido en toda su superficie. **D.** blastocisto que presenta dos grandes parches en la masa celular interna (flechas), uno de los cuáles se extiende hacia el trofoectodermo mural (flecha blanca). **E.** blastocisto que presenta marcaje preferentemente en el trofoectodermo; la masa celular interna queda sin teñir (flecha). **F.** blastocisto que presenta grandes grupos de células entremezclados con zonas en las que el marcaje se localiza en puntos por la mayor parte de su superficie. Este blastocisto se muestra desde el extremo opuesto a la masa celular interna. ICM: Masa celular interna; TE: Trofoectodermo.

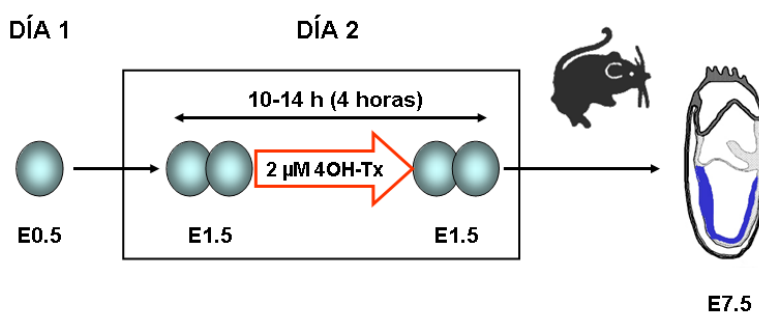


**Figura 17:** Análisis comparado de los resultados obtenidos en el tratamiento de los embriones de dos células con tamoxifeno durante la primera mitad del segundo día de desarrollo. Tras el tratamiento se dejó progresar a los embriones en cultivo hasta el estadio de blastocisto y se tiñeron para revelar la actividad  $\beta$ -galactosidasa. El gráfico muestra el número de embriones teñidos obtenidos frente al tipo de marcaje que presentaban. El 10% de los blastocistos presentan marcaje en toda su extensión, el 10% sólo presentan marcaje en el trofoectodermo, el 11% sólo en la masa celular interna y el 68% restante presentan parches que se distribuyen por ambos tejidos. Entre ellos, el 20% tienen más marcaje en el trofoectodermo que en la masa celular interna; el 19% presentan un marcaje mayor en la masa celular interna, y el 61% restante están marcados por igual en ambas partes.

Concentración de tamoxifeno	Nº de experimentos	Nº embr. teñidos	Solo TE	Sólo ICM	Todo el blastocisto	Parches en TE y ICM	
2 $\mu$ molar	14	107/230	11 (10%)	12 (11%)	11 (10%)	73 (68%)	15 TE>ICM 13 TE<ICM 45 TE=ICM

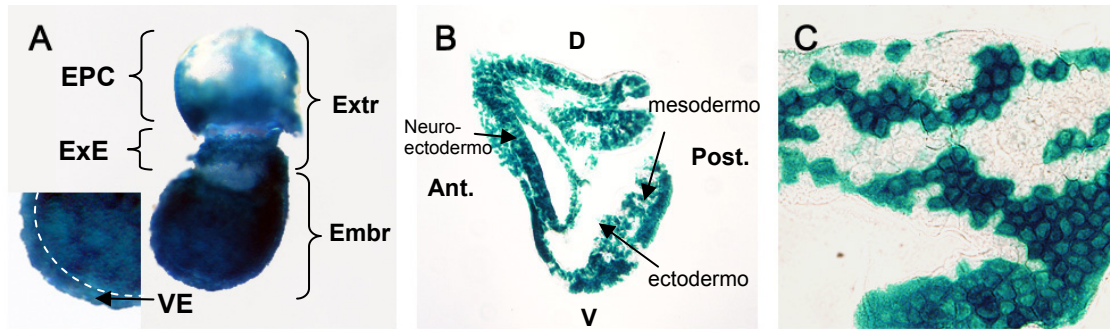
**Tabla 1:** Resumen de los resultados obtenidos al tratar embriones de dos células durante la primera mitad del segundo día de desarrollo y dejarlos progresar hasta el estadio de blastocisto.  
TE: Trofoectodermo. ICM: Masa celular interna.

El siguiente grupo de experimentos tiene como objetivo comprobar si en estadios posteriores la descendencia de los blastómeros del embrión en dos células se restringe a alguna de las capas germinales o se localizan preferentemente en los tejidos de origen embrionario o extraembrionario. Para ello se administró el tamoxifeno a los embriones en estadio de dos células durante cuatro horas entre las 10 y las 14 horas del segundo día de desarrollo, pero esta vez fueron transferidos a hembras pseudogestantes. A continuación, se les dejó progresar hasta el estadio E7.5, momento en el que fueron extraídos para su procesamiento (Fig. 18). Se recuperaron 138 embriones de un total de 668 embriones transferidos. De entre ellos, 5 estaban teñidos (3,6%) y presentaban el marcaje distribuido homogéneamente por toda su extensión. No se observó una tendencia especial en la localización de los grupos de células marcadas hacia ninguna región en particular del embrión. Tampoco se encontraron diferencias en cuanto al origen embrionario o extraembrionario de los grupos de células que aparecen marcadas y sin marcar, que aparecen en ambos casos (Fig.19). Después fueron cortados en secciones sagitales para su observación en detalle al microscopio. Así, aparecieron células marcadas entremezcladas homogéneamente con células sin marcaje. En otro grupo de experimentos se dejó a los embriones transferidos progresar hasta el estadio de E14.5, llegándose nuevamente al mismo resultado: las células teñidas no siguen un patrón especial y aparecen tanto en el embrión como en los tejidos extraembrionarios (no mostrado). Esto indica nuevamente que en el estadio de dos células los blastómeros todavía no están determinados para dar lugar con su descendencia a ningún tejido ni región específica del embrión. Estos resultados también descartan que el ensayo *in vitro* llevado a cabo anteriormente tenga un efecto sobre el desarrollo, ya que en este caso la mayor parte del desarrollo transcurre *in utero*.



**Figura 18:** Tratamiento de los embriones en el estadio de dos células durante 4 horas en la primera mitad del segundo día de desarrollo. A continuación se eliminó el tamoxifeno del medio y se transfirió los embriones a hembras pseudogestantes. Después, se les dejó progresar hasta el estadio E7.5 y se recuperaron para su análisis.





**Figura 19:** Embriones en el estadio E7.5 obtenidos tras un tratamiento con tamoxifeno en el estadio de dos células. **A**, un embrión entero en el que el marcaje se distribuye por toda su extensión. Cabe destacar que el marcaje aparece tanto en los tejidos embrionarios como extraembrionarios, incluido el endodermo primitivo (aumentado en la parte inferior izquierda); **B**, sección sagital de un embrión de estadio E7.5; **C** sección sagital de un embrión tratado, a mayor aumento. Se puede apreciar claramente cómo las células marcadas se entremezclan de forma aleatoria con las no marcadas. Ant.: anterior; Post.: posterior; D: dorsal; V: ventral. Extr.: Tejidos extraembrionarios. Embr.: Tejidos embrionarios. EPC: Cono Ectoplacentario. Exe: Ectodermo extraembrionario. VE: endodermo visceral.

### 6.1.3 Administración de tamoxifeno en estadio de cuatro células.

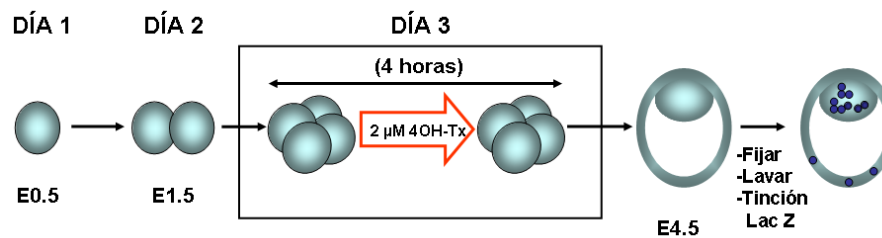
Una vez que observamos que no existe limitación de linaje en el embrión de dos células, nos planteamos un nuevo grupo de experimentos, esta vez encaminados a saber si desde el estadio de cuatro células, existe algún tipo de determinación de los blastómeros.

En estos experimentos se administró el tamoxifeno a embriones de cuatro células, también durante 4 horas y a una concentración de 2  $\mu$ molar, durante la primera mitad del tercer día del desarrollo (Fig. 20). Cuando se lleva a cabo un cultivo de embriones en estos momentos del desarrollo, se observa que no existe una sincronía. Esto quiere decir que la transición de dos a cuatro células se da de forma progresiva, con lo que no todos los embriones que se cultivan pasan a cuatro células simultáneamente. Durante una franja de unas 6 horas, los embriones sufren esta transición de forma desincronizada. El cultivo se compone durante la primera mitad del segundo día de desarrollo de una mezcla de embriones en dos, tres y cuatro células, por lo que no se les puede administrar el tamoxifeno a todos a la vez. Para salvar esta limitación, se administró el tamoxifeno en varias etapas en las que se iban tratando paulatinamente los embriones que alcanzaban el estadio de cuatro células. Después de cuatro horas de tratamiento, se lavó el tamoxifeno del medio y se dejó a los embriones progresar en cultivo hasta el estadio de blastocisto.

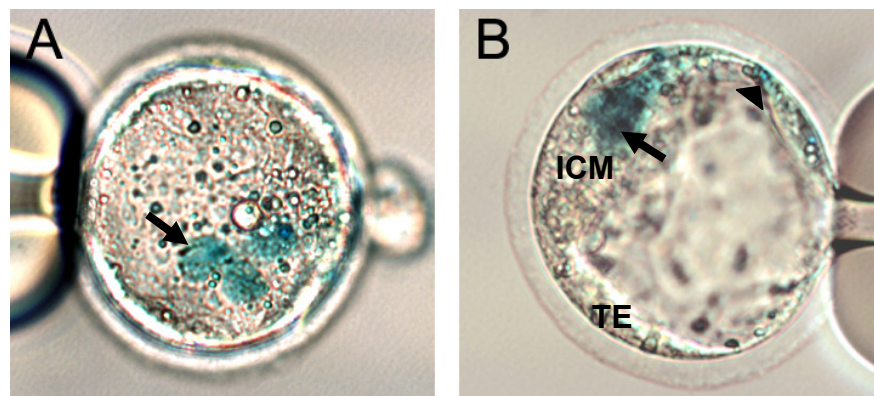
Como resultado de estos experimentos se obtuvieron blastocistos con expresión de *lacZ* distribuida por toda su extensión que no se localizaban específicamente en ninguna región concreta del blastocisto (Fig. 21). De un total de 22 embriones, 12 aparecieron marcados (54%). De ellos, 1 presentaba el marcaje sólo en el trofoectodermo (8%), 3 sólo en la masa celular interna (25%) y 7 tanto en el trofoectodermo como en la masa celular interna (58%). En estos experimentos, los grupos de células que aparecen marcados en los blastocistos tienen un tamaño menor que los que observamos en los blastocistos que provienen de embriones tratados en el estadio de dos células, como cabría esperar, con la excepción de un blastocisto en el que el marcaje parecía distribuirse por toda su extensión (8%) tras el tratamiento en

cuatro células. Esto es una muestra más de que en estos experimentos obtenemos una colección de blastocistos que reflejan todas las situaciones posibles con respecto al número de recombinaciones que se pueden producir. Por tanto, podemos considerar que no existe restricción en el potencial de los blastómeros del embrión de cuatro células con respecto al destino de sus descendientes en el estadio de blastocisto.

Para seguir cubriendo el resto de etapas del desarrollo temprano, en el futuro continuaremos haciendo experimentos similares en los que intentaremos marcar una sola célula en el embrión de 8 células, en el de 16 células y en los estadios sucesivos. Esto nos permitirá acotar el punto en el que las células adquieren un potencial restringido en su capacidad de contribuir a los diferentes linajes presentes en el blastocisto.



**Figura 20:** Tratamiento de los embriones en estadio de cuatro células durante 4 horas en la primera mitad del tercer día de desarrollo. A continuación se lavó el tamoxifeno del medio y se dejó progresar en cultivo a los embriones hasta el estadio de blastocisto. En este momento fueron fijados y teñidos para  $\beta$ -galactosidasa.



**Figura 21:** Blastocistos obtenidos tras administrar tamoxifeno a embriones en el estadio de cuatro células. Después del tratamiento se lavó el tamoxifeno del medio y se cultivó los embriones hasta el estadio de blastocisto. **A**, en este blastocisto se aprecia un pequeño grupo de células marcadas en el trofoectodermo mural (flecha). La fotografía muestra el polo abembrionario del blastocisto. **B**, este blastocisto presenta un grupo de células marcadas en un lado de la masa celular interna (flecha), que se continúan con células que aparecen marcadas en el trofoectodermo polar y el mural (punta de flecha). ICM: Masa celular interna; TE: Trofoectodermo.

En conclusión, todos estos resultados muestran como la técnica utilizada es eficaz a la hora de producir un único evento de recombinación tanto en el estadio de dos células como en el de cuatro. Además, hemos llevado a cabo ensayos en los que el tratamiento empleado ha demostrado no tener un efecto perjudicial sobre el desarrollo temprano del embrión. Así, hemos observado que los descendientes de cada blastómero que compone tanto el embrión de dos células como el cuatro no se restringen a ninguno de los tejidos que componen el blastocisto. De la misma manera, en estadios más tardíos del desarrollo, tampoco encontramos restricción de las células que provienen de aquellas que fueron marcadas en los mencionados estadios tempranos.

## **6.2 Mecanismos genéticos que subyacen a las primeras decisiones de linaje del embrión: la regulación y la expresión de *Cdx2*.**

Tras estudiar la contribución al blastocisto de los primeros blastómeros que forman el embrión, nos preguntamos cuáles pueden ser los mecanismos genéticos que intervienen en la especificación de los dos primeros linajes. Dado que *Cdx2* es el primer gen cuya expresión se restringe al trofoectodermo (Strumpf et al., 2005), parece importante conocer en detalle su sistema de regulación como parte fundamental de este mecanismo genético. Además, estudiamos la expresión de *Cdx2* en el embrión temprano del pollo, para compararla con la del ratón e intentar saber en qué medida está conservada su función, y así comprender el origen evolutivo del trofoectodermo.

### **6.2.1 Expresión de *Cdx2* en el embrión temprano del pollo:**

La expresión del gen *Cdx2* en el embrión del pollo ya había sido descrita anteriormente (Marom et al., 1997). Sin embargo, este trabajo se centraba en la expresión del gen desde el estadio HH4, cuando ya ha comenzado la gastrulación, en adelante y no estudiaba los estadios más tempranos. Se describe así su presencia en la línea primitiva desde su comienzo hasta un límite anterior localizado a la mitad de su extensión total y en las células adyacentes en el estadio HH4<sup>+</sup>. En los estadios siguientes su expresión se da en porciones cada vez más anteriores, para alcanzar la extensión total de la línea primitiva en el estadio HH6. En el momento en el que aparece el primordio de la cola (HH11), *Cdx2* se expresa fuertemente en esta estructura, y también en la parte posterior de la placa neural. Por último, la expresión deja de ser detectable a partir del estadio HH14.

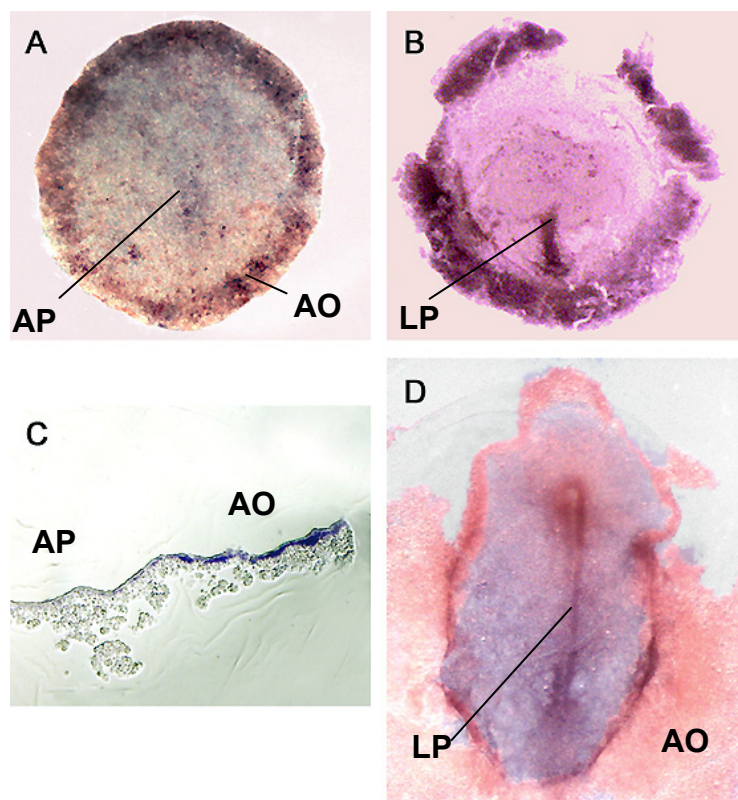
En nuestro estudio, se hace necesario conocer el patrón de expresión de *Cdx2* en estadios más tempranos del desarrollo, ya que nos interesan especialmente las fases en las que se producen los primeros linajes del embrión y su comparación con el blastocisto del ratón. Para ello, estudiamos mediante hibridación *in situ* el patrón de expresión de *Cdx2* entre los estadios tempranos que corresponden al momento de la puesta (estadios X, XI de Eyal-Giladi y Kochav: EGK), antes de que comience la gastrulación, y en estadios posteriores (hasta HH10).



En los embriones de los estadios más tempranos (EGK X, XI; Fig. 22A), el marcaje aparece en las porciones más periféricas que corresponden al área opaca. Esto se pudo corroborar en secciones transversales en las que se aprecia nuevamente cómo la expresión se restringe a la porción más dorsal del área opaca (Fig. 22C).

Posteriormente, en los embriones de estadio HH2 (Fig. 22B), este patrón se mantiene, ya que el área opaca sigue apareciendo marcada. Pero además, la línea primitiva que está comenzando a aparecer en la porción posterior del embrión muestra también de forma muy evidente el marcaje de la expresión de *Cdx2*. Por último, en el estadio HH4 (Fig. 22D) aparece nuevamente la línea primitiva marcada aunque, sólo en las porciones más caudales. En este punto del desarrollo el área opaca no presenta ya expresión de *Cdx2*.

Con el fin de comprobar si en estadios posteriores el patrón de expresión de *Cdx2* en el pollo es equiparable a aquél que se observa para el ratón, se utilizaron embriones de estadios más tardíos. Efectivamente, en el embrión de HH10 se puede apreciar cómo la expresión de *Cdx2* se restringe al primordio de la cola, donde aparece con gran intensidad (no mostrado). Este resultado es comparable al patrón de expresión descrito para *Cdx2* en el embrión del ratón entre los estadios E8.5 y E9.5 y para el embrión del pollo en estudios anteriores en los que se ha descrito también la expresión de este gen en el primordio de la cola y las regiones más caudales del embrión (Beck et al., 1995; Marom et al., 1997).



**Figura 22:** Embriones tempranos de pollo sobre los que se llevó a cabo hibridación *in situ* para detectar la expresión del gen *Cdx2*. **A**, embrión en el estadio EGK-X que muestra expresión en el área opaca, aunque no en la parte central, el área pelúcida. **B**, embrión en el estadio HH2 en el que se observa como la línea primitiva se marca desde su aparición, así como el área opaca. **C** muestra la zona de transición del área pelúcida al área opaca en una sección transversal de un embrión en estadio EGK-X. **D**, embrión en estadio HH4, muestra una clara tinción en la parte posterior de la línea primitiva y en el margen del área opaca en contacto con el área pelúcida. AO: área opaca; AP: área pelúcida; LP: línea primitiva.

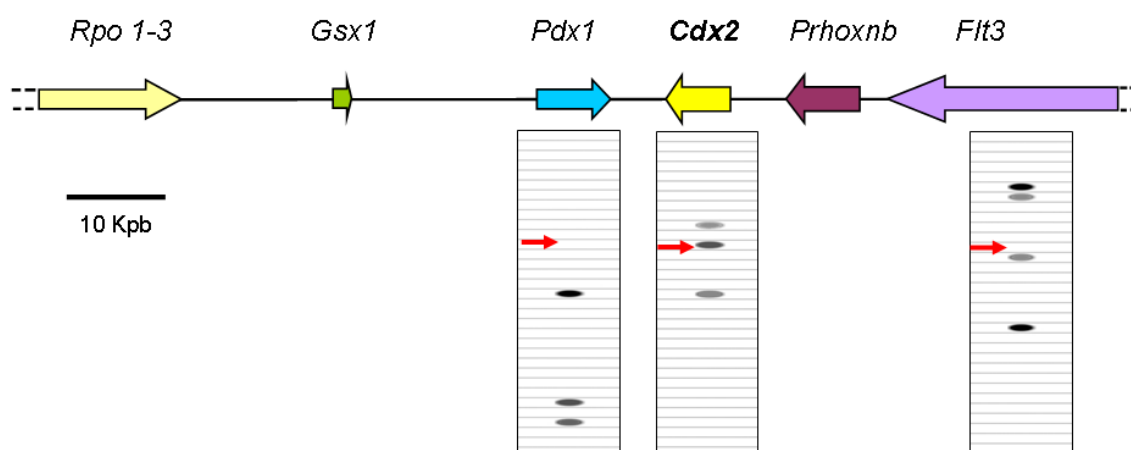
Estos resultados indican que en las fases más tempranas del desarrollo en las que hemos estudiado la expresión de *Cdx2*, se asemeja topológicamente a lo que se ha descrito para el embrión del ratón. En ambos casos, la presencia de *Cdx2* se restringe a la zona periférica del embrión, quedando ausente en el epiblasto. En los dos casos será ésta porción periférica del embrión de la que derivarán la mayor parte de los tejidos extraembrionarios.

Dado que los patrones de expresión presentan tales semejanzas en ambas especies, nos planteamos la pregunta de si los mecanismos de regulación de *Cdx2* están conservados evolutivamente entre mamíferos y aves, a pesar que se asuma que el trofoectodermo es una población celular exclusiva de mamíferos. Para intentar responder a esta pregunta llevamos a cabo un estudio comparado de la región genómica que contiene a *Cdx2* en diferentes vertebrados. La comparación de estas regiones nos permitirá la selección de secuencias candidatas para probar experimentalmente y conocer su capacidad de dirigir expresión génica.

### 6.2.2 Genómica comparada de *Cdx2* en vertebrados:

Como primer paso, se localizó este gen en su contexto genómico y se estudió la región cromosómica en la que se ubica. *Cdx2* se encuentra en el cromosoma 5 del ratón, como parte del complejo Parahox, que en el ratón está formado por los genes *Gsx1*, *Pdx1* y *Cdx2* (Fig.23). En la región 3' de *Cdx2* se encuentra el gen *Pdx1*, mientras que en la región 5' se hallan *Prhoxnb* y *Flt3*. *Flt3* (FMS-like tyrosine kinase) codifica para un receptor de tirosina quinasa que se expresa principalmente en células progenitoras hematopoyéticas y está implicado tanto en los procesos de proliferación como de diferenciación (Bullinger et al., 2008). *Prhoxnb* (Parahox cluster neighbour) codifica para una proteína similar a una decarboxi-liasa, aunque aún no está tan estudiado como sus genes vecinos y aún no hay información acerca de su patrón de expresión. *Pdx1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) codifica un factor de transcripción que se expresa en el tubo digestivo y el páncreas y es capaz de transactivar el promotor de la insulina (Ohlsson et al., 1993).

A continuación se hizo una búsqueda de *Cdx2* y los genes que le rodean en otras especies de vertebrados cuyos genomas han sido secuenciados. Las especies utilizadas en el análisis fueron: humano, ratón, pollo, un marsupial (*Monodelphis domestica*), el pez fugu (*Takifugu rubripes*) y la rana (*Xenopus tropicalis*). Sin embargo, estos genes no aparecen anotados como tales en todas las especies. Para localizar los genes que no aparecen anotados en estos genomas se utilizó la herramienta BLASTN, integrada en ensembl y se alineó la secuencia aminoacídica de *Cdx2* de ratón con estos genomas. Esta aproximación se basa en el hecho de que cuando un gen está rodeado por genes equivalentes en distintas especies y su orden se mantiene en el cromosoma, podemos hablar de regiones homólogas. Esto es lo que se denomina sintenia. La conservación del orden de los genes facilita la búsqueda de regiones no codificantes conservadas evolutivamente, y su uso como guía para la identificación de elementos reguladores.



**Figura 23:** Representación esquemática de la región en la que se encuentra *Cdx2* en el cromosoma 5 del ratón. *Cdx2* aparece rodeado de los genes *Pdx1*, *Gsx1* y *Rpo1-3* (subunidad AC2 de las RNA polimerasas I y III) en la región 3', mientras que en la región 5' aparecen los genes *Prhoxnb* y *Flt3*. Los genes que se tomaron como flanqueantes para este estudio fueron *Pdx1* y *Flt3*. En la parte inferior se muestra un gráfico con los perfiles de expresión basados en el número de ESTs (*expressed sequenced tags*) cuantificadas para cada gen en los diferentes tejidos mediante la aplicación *EST profile viewer* de la base de datos Unigene del NCBI. Las flechas indican el punto que simboliza la expresión en los tejidos extraembrionarios, que sólo está presente para *Cdx2*. Además, se puede observar como en términos generales el perfil de expresión de *Cdx2* y sus genes flanqueantes no solapa.

Al buscar los genes que rodean a *Cdx2* en otras especies nos encontramos con ciertas diferencias. La diferencia más destacable es la falta de conservación en el fugu. La sintenia de esta región se ha perdido en los peces teleósteos y mientras podemos encontrar en su genoma los miembros del grupo Parahox, su localización es dispersa a lo largo del genoma y no hay un ortólogo de *Cdx2* como tal (Siegel et al., 2007). Por otra parte, en todos los mamíferos estudiados los genes que rodean a *Cdx2*, así como el grupo Parahox completo y sus posiciones relativas están conservados. Con respecto al pollo, la región de donde se localiza *Cdx2* está conservada en su genoma, a excepción de *Prhoxnb*; por eso, en el pollo, el gen flanqueante de *Cdx2* en la región 5' es *Flt3* y será el que tomemos como referencia. Esto es especialmente importante cuando queremos acotar los límites de la región genómica que utilizaremos para su posterior análisis.

Para buscar secuencias candidatas en las inmediaciones de *Cdx2*, se tomó el intervalo entre sus genes vecinos en 5' y 3' en la región cromosómica en la que se encuentra exportando las secuencias mediante el navegador genómico ensembl (Hubbard et al., 2007). Existe la posibilidad de que con esta técnica localizáramos elementos que pertenecen a un sistema de regulación compartido por *Cdx2* y sus genes vecinos. Para descartar esta posibilidad, comparamos los perfiles de expresión de los genes flanqueantes *Flt3* y *Pdx1*, como se muestra en la figura 13. Estos perfiles de expresión se obtuvieron a través de la aplicación *EST Profile Viewer* de la base de datos Unigene del *National Centre for biotechnology Information* (NCBI) y muestran puntos que corresponden con el tejido en el que se han detectado transcritos del gen.

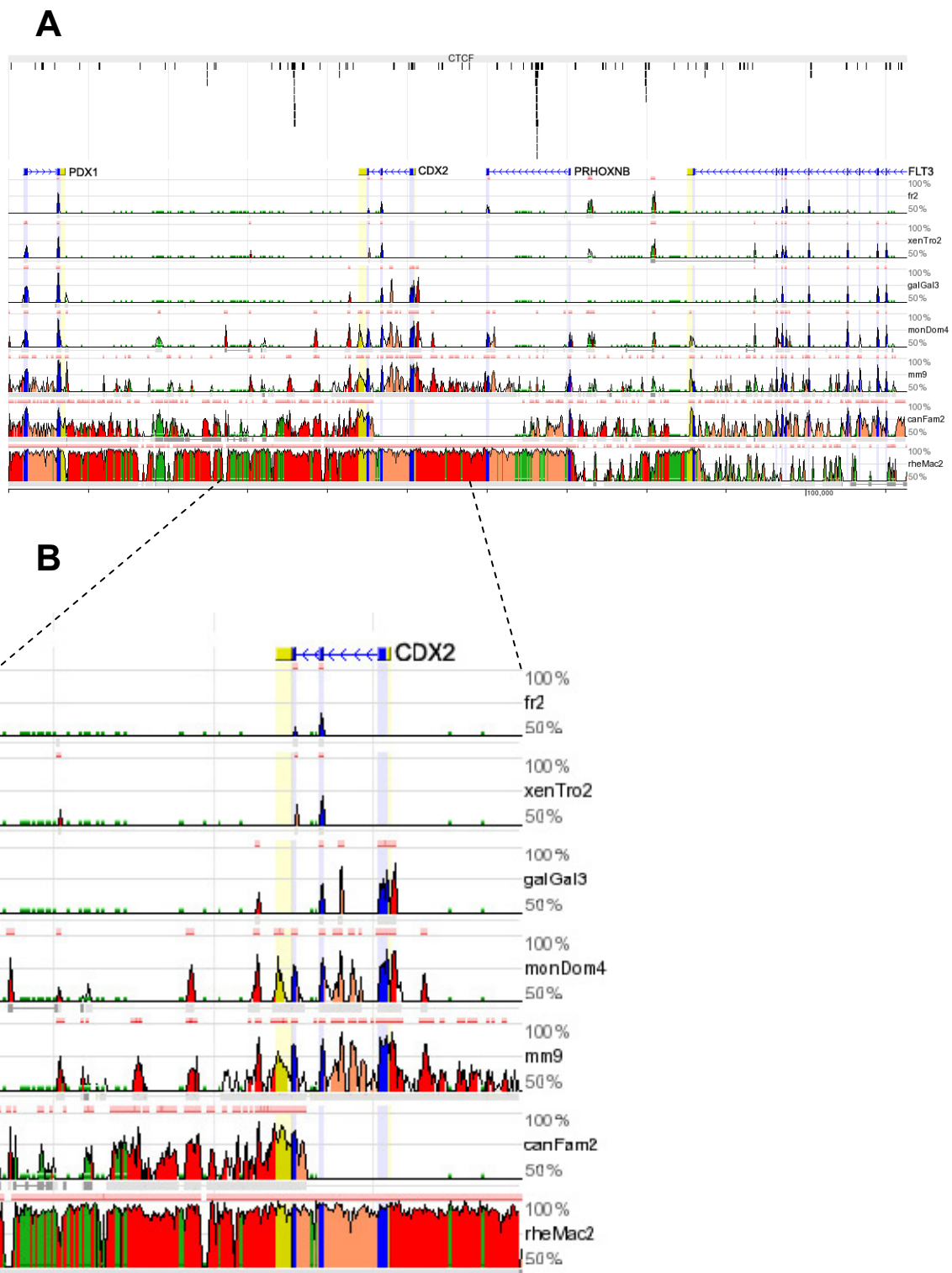
*Flt3* y *Pdx1* tienen perfiles de expresión no solapantes con el de *Cdx2* y el único gen que se expresa en los tejidos extraembrionarios es *Cdx2*. Por esta razón sería poco probable que los elementos responsables de la expresión extraembrionaria de *Cdx2* se localizaran fuera del intervalo elegido. Sin embargo, no podemos descartar la existencia de elementos reguladores en regiones más alejadas, que con este tipo de estudio quedan excluidas.

A continuación, los fragmentos genómicos seleccionados se alinearon usando varios algoritmos diferentes diseñados a tal efecto y los resultados obtenidos se analizaron para la elección de regiones candidatas. La lógica de este abordaje es simple: las regiones funcionales del genoma se hallan bajo presión selectiva por lo que su secuencia está más conservada que otras regiones.

Para obtener más información sobre la estructura de esta región cromosómica se estudió la localización de sitios de unión para la proteína CTCF, ya que se ha descrito su asociación con la presencia de potenciales elementos aisladores en el genoma humano. Los elementos aisladores delimitan regiones regulatorias que no sufren la influencia de elementos localizados en regiones vecinas. Así, impiden que estos elementos actúen sobre promotores no relacionados (Kim et al., 2007).

Tras hacer este análisis se encontraron dos picos claramente diferenciados que representan zonas en las que CTCF se une con alta frecuencia. Están localizados a ambos lados del gen *Cdx2*, en la región 3' y solapando con el gen *Prhoxnb*, en la región 5' (Fig. 24). Este hecho sugiere nuevamente que el entorno regulatorio de *Cdx2* se encuentra dentro del intervalo génico que hemos elegido para el análisis.

Con esta información, se seleccionaron definitivamente las secuencias candidatas englobando una o varias de las regiones conservadas, dependiendo de su distancia. Todas las secuencias se compararon con bases de datos para descartar que correspondan con zonas transcritas no anotadas o elementos repetidos. Así, se obtuvieron varias regiones conservadas hasta *Monodelphis*, entre las que destacan una región bien delimitada en la zona 5' de *Cdx2*, otra de mayor tamaño en la región 3' y una región también de gran similitud dentro del primer intrón de este gen. A continuación, se tomó una región más que sólo estaba conservada hasta el pollo, que se corresponde con un pico en la región más 3' del intrón (Fig. 26A). Estos fragmentos se amplificaron por PCR desde un clon BAC genómico y se generaron construcciones en las que se unieron a un promotor mínimo y un gen marcador para su posterior microinyección pronuclear en oocitos fertilizados. Curiosamente, en el genoma del perro apenas se puede apreciar conservación en la mayor parte de la región codificante de *Cdx2* así como la región 5'. Aunque en realidad si habría conservación en esta zona, este resultado podría deberse al algoritmo utilizado a la hora de generar los alineamientos precomputados en este servidor (Fig. 24B).



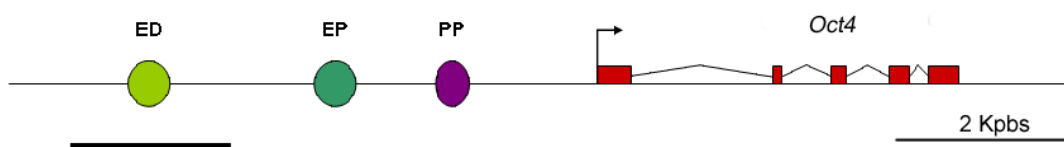
**Figura 24:** Se muestra un alineamiento precomputado, obtenido mediante el programa Mulan, disponible en el servidor DCODE (Ovcharenko et al., 2005). **A**, Resultado del alineamiento múltiple de la región que contiene el gen *Cdx2* en el fugu (*fr2*, *Takifugu rubripes*), la rana (*xenTro2*, *Xenopus tropicalis*), el pollo (*galGal3*, *Gallus gallus*), un marsupial, la zarigüeya (*monDom4*, *Monodelphis domestica*), el ratón (*mm9*, *Mus musculus*), el perro (*canFam2*, *Canis familiaris*) y el mono (*rheMac2*, *Macaca mulata*; de arriba abajo), usando el genoma humano como base. En la parte superior se muestra el perfil de unión de la proteína CTCF a lo largo de esta región genómica (Barski et al., 2007). **B**, Visión aumentada de la zona codificante de *Cdx2* y las regiones que la rodean. Llama la atención el hecho de que en el genoma del perro la mayor parte de la zona codificante de *Cdx2*, así como la región 5' no aparecen como zonas conservadas en el gráfico. Probablemente esto se deba al algoritmo que utiliza el programa con el que se generó el alineamiento precomputado, aunque no responde a la situación real, en la que sí habría conservación. Las regiones conservadas se representan como picos en el gráfico, en el que el eje x representa la posición en el genoma base y en el eje y se representa el porcentaje de identidad entre el genoma base y los genomas alineados con él. En azul se representan las regiones correspondientes a los exones, mientras que en amarillo se representan las regiones no traducidas (UTRs). Las regiones conservadas que no pertenecen a exones se representan en rojo si son intergénicas y en rosa si corresponden a intrones.

### 6.2.3 Ensayos de actividad reguladora en blastocistos de ratón:

En este trabajo se microinyectaron oocitos fertilizados para generar blastocistos transgénicos con el objeto de analizar la capacidad reguladora de las secuencias candidatas de la región cromosómica de *Cdx2*. En estos experimentos se generaron transgénicos transitorios porque eso permite la obtención de resultados en 3-4 días, frente a los 6-12 meses que se requieren para generar líneas estables, y esto se ajusta bien a la necesidad de conocer el comportamiento de las secuencias candidatas en el periodo de preimplantación. El primer paso fue validar el abordaje experimental para comprobar que permita el estudio de los elementos reguladores en este periodo del desarrollo, ya que la aproximación más frecuente en la literatura previa es el uso de embriones en estadios de postimplantación. Las ventajas de trabajar en el periodo de preimplantación son varias. En primer lugar y como ya se ha indicado, el tiempo para obtener embriones transgénicos se reduce. Por otra parte, no se requiere transferir los embriones microinyectados a hembras pseudogestantes, lo cuál incrementa notablemente el rendimiento del experimento.

Este sistema presenta no obstante potenciales problemas, ya que es conocido que los ratones transgénicos obtenidos por microinyección pronuclear presentan un cierto grado de mosaicismo. Por tanto, al evaluar los resultados de los experimentos de microinyección deberemos tener en cuenta que los blastocistos obtenidos podrían ser mosaicos para la expresión del transgén.

Para asegurarnos de la fiabilidad de los resultados obtenidos con las construcciones seleccionadas, se utilizó tanto un control positivo como negativo del vector empleado. Como control positivo se empleó una construcción en la que se clonó un elemento previamente descrito en la literatura (Yeom et al., 1996) que dirige fuertemente la expresión del gen *Oct4* en todo la masa celular interna, así como en células ES (Fig. 25). Tras la microinyección de esta construcción se obtuvieron blastocistos que presentaban un fuerte marcaje para  $\beta$ -galactosidasa por toda su extensión, de forma reproducible en todos los experimentos. Cuando se probó esta construcción experimentalmente se obtuvieron 40 blastocistos, de los cuales 34 estaban marcados con *lacZ* (85%). De éstos, se encontró parches grandes que se localizaban preferentemente en la masa celular interna, aunque también en la superficie externa del blastocisto (60% del total) o bien un intenso marcaje homogéneo por todo el blastocisto (40% del total). Esto último también se observa en la descripción original de este elemento regulador en líneas transgénicas estables (Yeom et al., 1996).



**Figura 25:** Representación esquemática del locus *Oct4*, localizado en el cromosoma 17 del ratón. Aparece reflejada la región *upstream* de 3,3 Kpbs (barra horizontal) que se amplificó por PCR para utilizarla como control positivo en los ensayos de microinyección. ED: *Enhancer distal*, EP: *Enhancer proximal*, PP: *Promotor proximal*. Basado en Yeom (1996).

El control negativo utilizado consiste en el vector en el que no se clonó ningún fragmento de DNA por encima o por debajo del promotor mínimo de la  $\beta$ -globina humana. Con esta construcción se obtuvo una expresión débil de *lacZ* en 2 embriones de 18 (11%), tanto en la masa celular interna como en el trofoectodermo polar.

construcción	Número de experimentos	Nº transg./total	porcentaje de transgénicos
1	5	23/116	20%
2	6	13/134	9,7%
3	7	26/102	25%
4	3	2/48	4%
5	4	8/17	47%
control + <i>lacZ</i>	2	34/40	85%
control - <i>lacZ</i>	2	2/18	11%
control + RFP	2	12/15	80%
control - RFP	2	0/42	

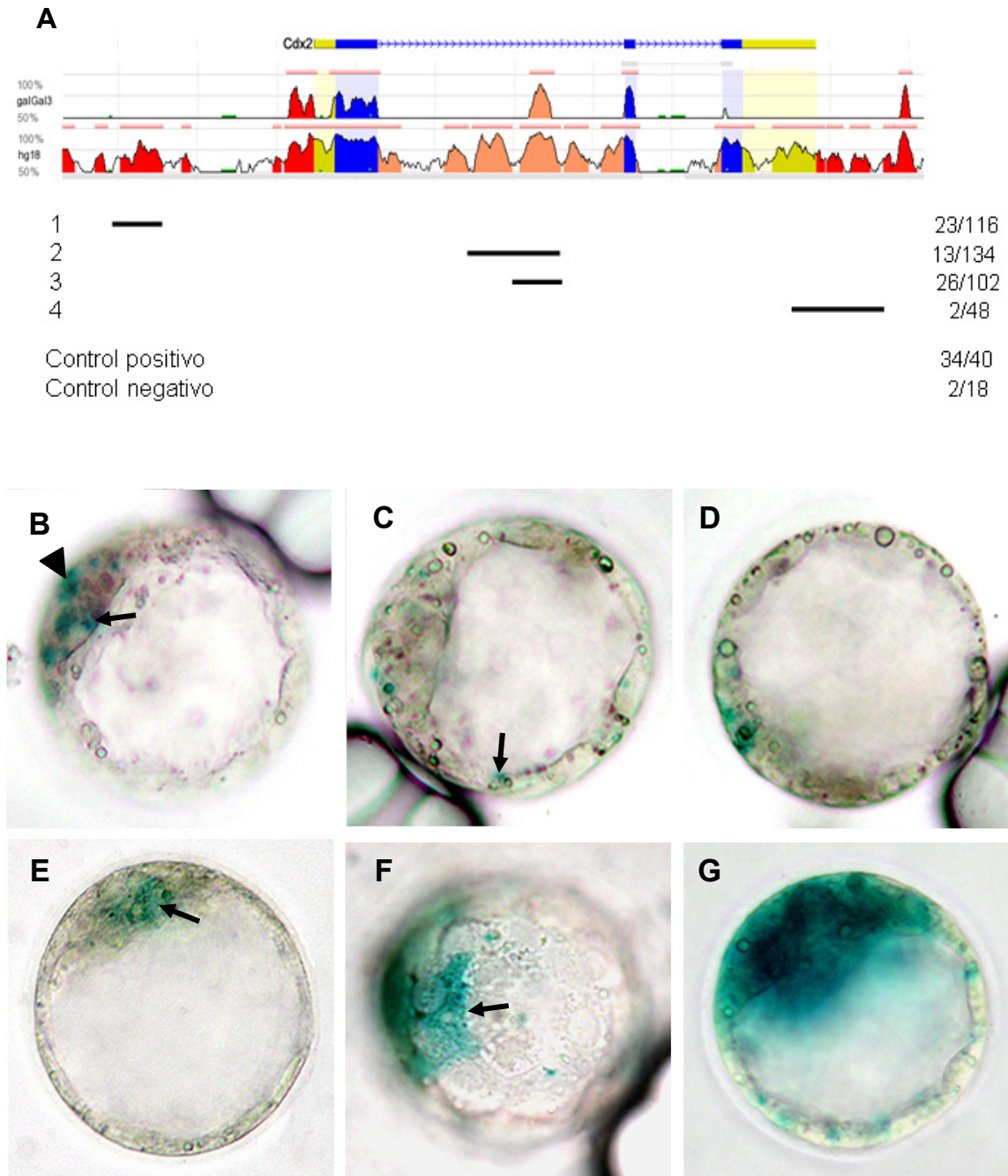
**Tabla 2:** Resumen de los resultados obtenidos en la microinyección de las regiones candidatas seleccionadas para *Cdx2*, así como de los controles utilizados.

La microinyección de la construcción número 1, la región conservada localizada por encima (*upstream*) de la región codificante de *Cdx2* (Fig. 26A), dio como resultado un intenso marcaje en forma de parches en la masa celular interna y en el trofoectodermo polar, aunque también aparecían numerosos puntos de expresión de *lacZ* en el resto del trofoectodermo (Fig. 26B-D). En este caso los blastocistos con este marcaje representaban un 20% del total de embriones inyectados.

Al microinyectar la construcción que contiene las dos regiones conservadas hallados en el primer intrón de *Cdx2* (construcción 2, Fig. 26A), se obtuvo como resultado blastocistos en los que el marcaje aparece de forma esporádica en el trofoectodermo y la masa celular interna. Sin embargo, se obtuvieron un 9,7% de blastocistos transgénicos, un porcentaje similar al obtenido con el control negativo, por lo que consideramos que este fragmento carecía de actividad en el blastocisto.

La construcción que incluye el pico de mayor conservación dentro del primer intrón de *Cdx2* (número 3, Fig. 26A), produjo un patrón de marcaje más consistente en el blastocisto. Se observaban tanto pequeños puntos de débil marcaje en la masa celular interna (Fig. 26E) como grandes parches más extendidos preferentemente por el trofoectodermo (Fig. 26F), aunque en algunos casos el marcaje fue mucho más intenso y abarcaba casi todo el blastocisto (Fig. 26G). En este caso se obtuvieron un 25% de blastocistos positivos del total que alcanzaron el estadio E4.5 tras la microinyección y el posterior cultivo.





**Figura 26:** Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de microinyección de los fragmentos en los que se usó como gen marcador *lacZ*. **A**, el gráfico muestra un alineamiento de la zona codificante de *Cdx2* junto con las regiones adyacentes entre los genomas del pollo y el genoma humano, obtenido del servidor VISTA (Frazer et al., 2004). El código de colores se corresponde con el empleado en la figura 24. En la parte inferior están representados mediante líneas horizontales y numerados del 1 al 4 los fragmentos que se amplificaron para probar experimentalmente su capacidad reguladora. A continuación se muestran los valores de los resultados obtenidos en la microinyección de las construcciones que se utilizaron como controles. **B-D**, blastocistos obtenidos en experimentos en los que se microinyectó el fragmento número 1. Se obtuvieron grupos de células marcadas en la masa celular interna (**B**, flecha) y el trofoectodermo polar (**B**, punta de flecha), pero también en el trofoectodermo mural (**C**, flecha). **E-G**, blastocistos obtenidos en los experimentos en los que se microinyectó la construcción número 3. **E**, el marcaje aparece en forma de pequeños puntos en la masa celular interna (**E**, flecha), en grandes grupos de células en el trofoectodermo (**F**, flecha) e incluso distribuido por la mayor parte de la superficie del blastocisto (**G**).



A continuación, se ensayó la capacidad de dirigir la expresión génica del fragmento localizado en 3' (*downstream*), el número 4 (Fig. 26A), y apenas se obtuvo señal en el blastocisto. El porcentaje de embriones teñidos obtenidos con esta construcción es incluso menor de los que se obtuvieron con el control negativo. Por ello, consideramos que este elemento carecía de actividad reguladora en el blastocisto.

Como resumen de estos resultados, podemos afirmar que los fragmentos 1 y 3 poseen actividad en el blastocisto y que dirigen la expresión del gen marcador más o menos por toda su extensión, y sin especificidad de linaje. Además, los experimentos en los que estudió las regiones número 2 y 4 dieron como resultado la carencia de actividad de estos fragmentos. Resulta llamativo que mientras un subfragmento del intrón (construcción número 3) dirige expresión, cuando se prueba una región más amplia (construcción número 2), el porcentaje de embriones que expresan el marcador es prácticamente idéntico al fondo experimental. Estos resultados parecen indicar la existencia de elementos adicionales positivos y negativos dentro del intrón que modulan la actividad de *Cdx2*.

Otra conclusión de estos experimentos es que las regiones no codificantes evolutivamente conservadas entre mamíferos y aves no son capaces de dirigir la expresión de manera específica en el trofoectodermo.

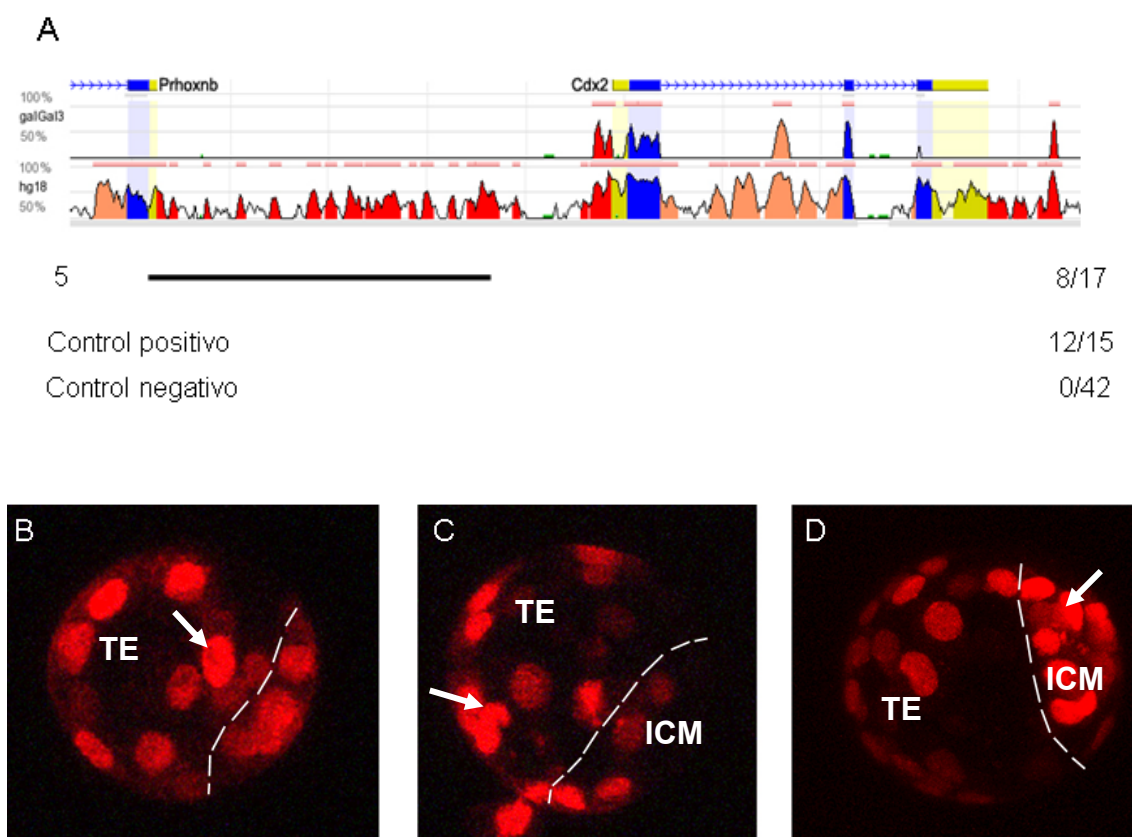
Es por ello por lo que se decidió ampliar el estudio a otras regiones genómicas del entorno de *Cdx2*, con el objeto de encontrar elementos que dirijan fuertemente la expresión de *Cdx2* en el trofoectodermo. Teniendo en cuenta que esta estructura es exclusiva de los mamíferos, parecería probable entonces encontrar estos elementos fuera de las regiones conservadas en el resto de vertebrados utilizados en los alineamientos múltiples.

Por otra parte, la observación de los resultados obtenidos tras la utilización de *lacZ* como gen marcador nos hizo pensar que este sistema podría suponer una limitación. Esto se debe a que la expresión génica obtenida con estos fragmentos es más bien débil y en algunos casos aparentemente inespecífica. Además, con esta técnica visualizamos la localización de la proteína  $\beta$ -galactosidasa, el producto del gen *lacZ*, que se localiza en el citoplasma. Esto genera una señal difusa y más difícil de observar en algunos casos. Para solucionar esta limitación, empleamos otro gen marcador: mRFP-1. La versión de este gen que hemos utilizado codifica para una proteína fluorescente roja, pero además está fusionada a la histona H2B, que posee señales de tipo NLS (secuencia de localización nuclear) en el extremo aminoterminal (Mosammaparast et al., 2001). Esto produce una señal más intensa, concentrada en el núcleo de la célula, y por tanto más fácil de visualizar.

En este grupo de experimentos se empleó como control positivo el vector con RFP como gen marcador, en el que se clonó el elemento distal que dirige la expresión de *Oct4* mencionado anteriormente (Yeom et al., 1996). En estos experimentos se obtuvo una fuerte señal de fluorescencia en los blastocistos que aparece localizada preferentemente en la masa celular interna en 12 de los 15 embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto (80%). Por otra parte, se usó como control negativo el vector con RFP en el que no se clonó ningún elemento

regulador. En este caso no se obtuvo señal alguna de fluorescencia en ninguno de los 42 blastocistos obtenidos.

Hasta el momento se ha ensayado en varias sesiones de microinyección la capacidad reguladora de un fragmento distal de 5Ks localizado en la región 5' de la zona codificante de *Cdx2* (Fig. 27A), que esté conservado entre humano y ratón. El patrón de expresión observado para este fragmento consiste en grandes parches que se distribuyen por toda la región del trofoectodermo, y no aparecen en la masa celular interna (Fig. 27 B-D). Los resultados de todos los experimentos de microinyección se resumen en la tabla 2.



**Figura 27:** Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de microinyección del fragmento 5, en los que se usó como gen marcador RFP. **A**, el gráfico muestra un alineamiento de la zona codificante de *Cdx2* junto con las regiones adyacentes, entre los genomas del pollo y el genoma humano, obtenido del servidor VISTA (Frazer et al., 2004). El código de colores se corresponde con el empleado en la figura 24. En la parte inferior está representado mediante una línea horizontal el fragmento número 5. A continuación se muestran los valores de los resultados obtenidos en la microinyección de las construcciones que se utilizaron como controles. **B**, **C**, imágenes obtenidas por microscopía confocal de blastocistos que muestran expresión de RFP dirigida por el fragmento 5. Se aprecian los núcleos de las células marcadas a lo largo de toda la extensión del trofoectodermo (flechas). **D**, blastocisto obtenido como resultado de la microinyección de la construcción con un *enhancer* distal de *Oct4* utilizada como control positivo. Se pueden apreciar las células marcadas en todo el blastocisto y con especial intensidad en la masa celular interna. La línea discontinua marca el límite aproximado de la masa celular interna. TE: Trofoectodermo; ICM: Masa celular interna.



## 7 Discusión



En este trabajo nos hemos planteado la pregunta de en qué momento y mediante qué mecanismos se determinan los linajes que forman el blastocisto del ratón. En los primeros momentos de su desarrollo, el embrión del ratón sufre varias rondas de divisiones desde el cigoto hasta la mórula, en las que las células quedan comprometidas en algún momento y su potencial se restringe.

Con el objeto de determinar cuándo ocurre esta restricción, hemos empleado un sistema genético de trazado de linajes con el que hemos obtenido resultados que nos permiten afirmar que los blastómeros que componen el embrión de dos y cuatro células no están aún comprometidos en este sentido. Pero esta pregunta no ha de afrontarse únicamente en términos mecanísticos, sino que debemos atender también al correlato genético que subyace a estos fenómenos morfológicos. Por ello, es importante prestar atención a los genes que se expresan en este momento y considerarles como una parte de los mecanismos implicados en las primeras decisiones de linaje. En el ratón se ha descrito un número relativamente limitado de genes que forman la red regulatoria implicada en la segregación de los tres tipos celulares que componen el blastocisto. Entre ellos, destaca la función de *Cdx2*, ya que es el primer gen conocido cuya expresión se restringe al trofoectodermo durante el desarrollo del ratón.

Si bien durante las dos primeras divisiones del embrión no se especifican los linajes que compondrán el blastocisto, es probable que los fenómenos morfogenéticos que tienen lugar a partir de la tercera división sean determinantes. Es en este momento cuando se detecta por primera vez la expresión de *Cdx2* en los blastómeros, aunque de una forma general y no limitado a ninguno de ellos (Dietrich y Hiiragi, 2008). Por tanto, es probable que los mecanismos regulatorios que restringen su expresión en los siguientes estadios estén implicados en esta decisión de linaje.

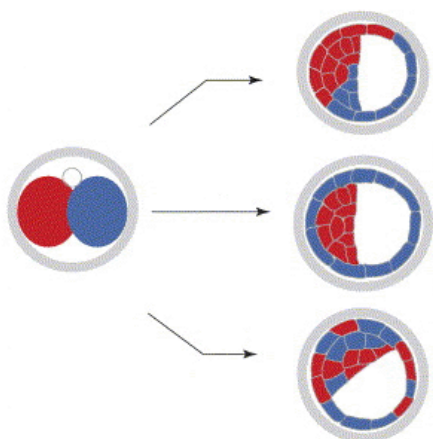
Sin embargo, la presencia de *Cdx2* como parte de la red regulatoria de genes que controlan este proceso parece ser exclusiva de los mamíferos euterios. En el estudio filogenético que hemos llevado a cabo hemos encontrado *Cdx2* en todas los vertebrados examinados excepto en el pez fugu. Pero al examinar las regiones conservadas hemos llegado a la conclusión de que el único elemento que restringe la expresión de *Cdx2* al trofoectodermo, está conservado únicamente entre los mamíferos euterios. Estos resultados apoyan también la idea de que probablemente el patrón de expresión que hemos observado en el pollo, no está controlado por el mismo sistema de elementos reguladores que lo hace en el ratón.

## 7.1 ¿En qué momento se determinan los linajes que formarán el blastocisto?

Para abordar esta pregunta hemos utilizado un sistema de trazado genético de linaje, que ha demostrado ser ventajoso frente a otras aproximaciones experimentales (Joyner y Zervas, 2006). Esta técnica marca células de una forma permanente que permite seguir su descendencia, pero a la vez ofrece la ventaja de no ser invasiva al contrario de otros métodos físicos de marcaje (Dil, DiO). La técnica se basa en la recombinación de un locus que contiene un gen marcador, por medio de una recombinasa cuya actividad es a su vez inducible mediante la administración de tamoxifeno. Además, es lo suficientemente sensible como para que el nivel de tamoxifeno se pueda disminuir hasta niveles capaces de activar el marcaje en una sola célula (Arques et al., 2007; Legue y Nicolas, 2005).

Cuando nos formulamos la pregunta de si uno de los blastómeros del embrión en dos células está ya comprometido a un destino definido en el blastocisto, surgen varias posibilidades teóricas que merece la pena tener en cuenta. En primer lugar, es posible que los descendientes de cada uno de los blastómeros se ubiquen con una cierta tendencia en regiones definidas dentro del blastocisto, aunque sin definir un único linaje (Fig. 28, parte superior). Otra posibilidad sería que existiera una segregación completa de los linajes ya en el estadio de dos células, donde uno de los blastómeros dé lugar sólo al trofoectodermo, mientras que el otro contribuya con su descendencia únicamente a la masa celular interna (Fig. 28, parte central). Esta hipótesis ha sido propuesta recientemente, basada en la expresión restringida de *Cdx2* a uno de los dos blastómeros en el estadio de dos células (Deb et al., 2006), aunque la validez de dicho trabajo ha sido puesta en duda y ha sido retractado (Roberts et al., 2007). Por último, podríamos pensar en una tercera posibilidad en la que ninguno de los dos blastómeros tuviera un destino prefijado, quedando su descendencia distribuida al azar en el blastocisto (Fig. 28, parte inferior).

En los últimos años, numerosos grupos de investigación han intentado responder a esta pregunta, lo cuál ha conducido a la publicación de varios trabajos a este respecto. Sin embargo, todavía no se ha llegado a una respuesta clara, ni tan siquiera a un consenso entre los investigadores interesados en este campo.



**Figura 28:** Diferentes posibilidades teóricas sobre la contribución que la descendencia de cada uno de los dos blastómeros del embrión de dos células podría hacer al blastocisto. Parte superior: cada uno contribuye a una región del blastocisto, aunque no a un tejido específico. Parte central: cada uno contribuye a uno de los dos tejidos del blastocisto. Parte inferior: su descendencia se distribuye al azar en el blastocisto. Modificado de Zernicka-Goetz (2006).

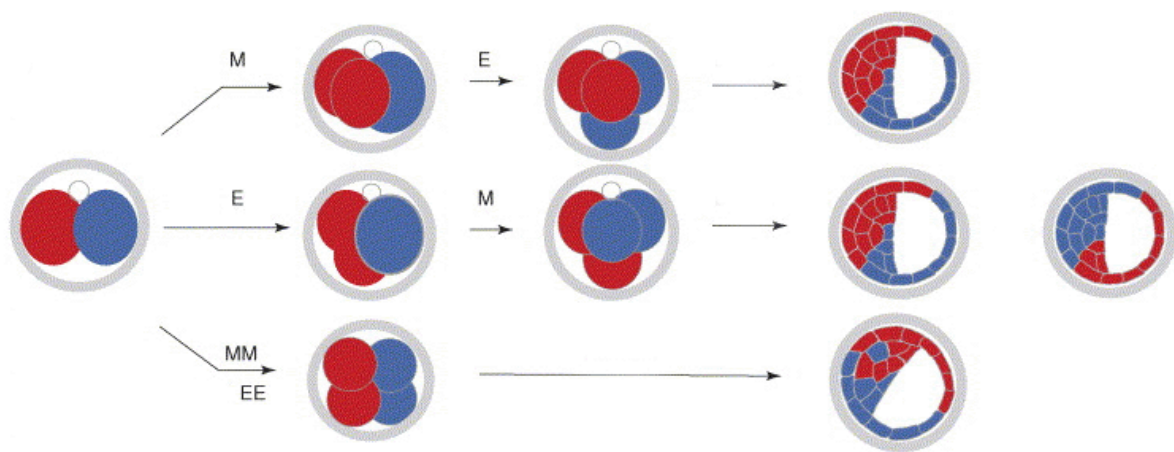
Nuestros resultados indican que los blastómeros que componen el embrión de dos o cuatro células no están determinados para contribuir a un destino concreto en el blastocisto ni en estadios posteriores del desarrollo. Al seguir la descendencia de estos blastómeros mediante la mencionada técnica de trazado genético, encontramos que sus descendientes se distribuyen de forma totalmente aleatoria en el blastocisto. Estas células no tienden a ubicarse preferentemente ni en el polo embrionario ni en el abembrionario, ni en ninguna región específica del blastocisto, ni en ningún tejido en concreto.

Este resultado es coincidente con varias publicaciones previas que afirman que en estadios tan tempranos como el embrión de dos células, los blastómeros aún no se han comprometido y no tienen un destino concreto (Alarcon y Marikawa, 2005; Chroscicka et al., 2004; Motosugi et al., 2005). En un trabajo más reciente (Kurotaki et al., 2007) se llega a resultados similares a los nuestros tras hacer un trazado de linaje mediante una técnica diferente. En ese trabajo se utilizó una línea de ratones transgénicos que expresan de forma ubicua la proteína *Kikume Green-Red*. Esta proteína emite fluorescencia verde que puede ser convertida a rojo tras la exposición de la proteína a radiación ultravioleta. Para marcar las células, se expuso a una parte de un embrión de dos células a luz ultravioleta. De esta forma se obtiene un blastómero verde y uno rojo para poder seguir su descendencia. Las células rojas y verdes formaban dos grupos diferenciados en el blastocisto, si bien sus límites no se ajustan al eje embrionario-abembrionario. Cabe objetar que en este caso las células rojas no se corresponderían exactamente con los descendientes del blastómero marcado, ya que la modificación que se ejerce en el estadio de dos células no se hereda genéticamente. En lo sucesivo las células hijas no expresarían más esta proteína roja, sino verde, por lo que no estaríamos ante un verdadero estudio de linaje. Otros trabajos llegan a conclusiones similares (Louvét-Vallee et al., 2005), aunque no mediante un trazado de linaje, sino analizando la transición de dos a cuatro células en busca de patrones de división estereotipados que permitieran prever el destino de los blastómeros. Nuevamente, estos estudios concluyen que la transición de dos a cuatro células se da de forma aleatoria y los blastómeros cambian dinámicamente de posición, con lo que no se puede hablar de un destino prefijado para estas células.

Esta visión no la comparten todos los grupos que se han aproximado a este problema. El grupo de Magdalena Zernicka-Goetz ha llegado a conclusiones contrapuestas tras fijarse en el patrón que sigue la segunda división mitótica, por la que el embrión pasa de dos a cuatro células. Tras estas observaciones encuentran diferencias entre embriones con respecto a la orientación de esta segunda división, que puede ser ecuatorial o meridional (Piotrowska-Nitsche y Zernicka-Goetz, 2005; Fig. 29). En los embriones de dos células que sufren primero una división meridional (M) y después una división ecuatorial (E), la descendencia del primer blastómero que se divide contribuiría preferentemente al polo embrionario y la del otro al resto (Fig. 29, parte superior). Cuando el primer blastómero se divide de forma ecuatorial y el segundo meridional, la descendencia de ambos se restringe a cualquiera de los polos embrionario o abembrionario del blastocisto (Fig. 29, parte central). Estos dos casos supondrían el 81% del



total de embriones que se obtienen en el cultivo, y ambas posibilidades serían equiprobables. Cuando los embriones se dividen de esta forma dan lugar a “tétradas”, embriones de cuatro células en los que las células toman una disposición tridimensional. Sin embargo, en el 19% de los casos restantes, las dos divisiones son meridionales o ecuatoriales. En estos embriones las cuatro células quedan en el mismo plano. De acuerdo con este trabajo, en ésta última situación la contribución de los dos primeros blastómeros del embrión se distribuye siempre al azar en el blastocisto (Fig. 29, parte inferior).



**Figura 29:** Influencia de la orientación de la segunda división del embrión en la contribución de los blastómeros tempranos al blastocisto. Según esto, cuando la primera división que sufre el embrión de dos células es meridional (M) y la segunda ecuatorial (E), el primer blastómero que se divide contribuye preferentemente al polo embrionario del blastocisto (parte superior). Cuando la primera división en el embrión de dos células es ecuatorial y la segunda meridional, la descendencia de cualquiera de los dos blastómeros se restringe indistintamente al polo embrionario o abembrionario del blastocisto (parte central). Finalmente, cuando las dos divisiones que sufren los blastómeros que componen el embrión en dos células son meridionales o ecuatoriales, su descendencia se distribuye al azar en el blastocisto (parte inferior). Modificado de Zernicka-Goetz (2006).

En nuestro trabajo no hemos cuantificado específicamente el porcentaje de embriones de cuatro células que adquiere cada una de las dos posibles topologías. Sin embargo cabe señalar que en cualquier caso la gran mayoría fueron siempre embriones de tipo “tétrada” (Fig. 14A), cuya observación por el contrario nos llevan a afirmar que la descendencia de los dos primeros blastómeros se distribuye al azar.

Hay que destacar que en este tipo de experimentos se marcaron las células físicamente con marcadores fluorescentes. Como ya se mencionó, el desarrollo es extremadamente regulado en estos estadios. Técnicas como la inyección o incluso la aplicación directa de trazadores sobre la superficie celular que se emplean en los trabajos de este grupo (Piotrowska y Zernicka-Goetz, 2001) podrían tener una repercusión decisiva sobre las fases siguientes, llegando incluso a desencadenar fenómenos de compensación por parte de las células adyacentes.

Fujimori y colaboradores (Fujimori et al., 2003) llegaron a conclusiones similares marcando las células mediante la inyección de un vector de expresión de Cre que produce la expresión heredable de una proteína fluorescente. Según este trabajo la descendencia de cada uno de los dos blastómeros se localiza en el polo embrionario o abembrionario del blastocisto. No obstante, afirman que con posterioridad a este estadio se produciría una mezcla no coherente de las células marcadas y no marcadas, tal y como observan ya en el estadio E8.5, lo que coincide con nuestros resultados. Una clara evidencia de que la técnica empleada perturba el desarrollo en estas fases es el hecho de que la célula inyectada es siempre la última en dividirse para dar lugar al embrión de cuatro células.

Por último, el grupo de Richard Gardner (Gardner, 2001) ha concluido también que los dos primeros blastómeros contribuyen de forma diferencial a ambos polos del blastocisto. Este trabajo se llevó a cabo inyectando gotas de aceite a través de la zona pelúcida para marcar el punto en el que se encuentra el segundo cuerpo polar como referencia del eje de la primera división, lo cual una vez más podría tener una repercusión sobre el desarrollo del embrión. Además, en algunos de estos trabajos (Fujimori et al., 2003; Gardner, 2001) se fijaron los embriones al sustrato en el que se cultivaban. Esto podría repercutir sobre los potenciales movimientos de los blastómeros y sobre la tensión que ejerce la zona pelúcida sobre ellos y por tanto llevar a resultados diferentes de los que se producirían en condiciones normales.

Todas estas diferencias técnicas, junto con las diferencias en las cepas de ratón utilizadas en los diferentes laboratorios podrían ser la causa de la disparidad de resultados con respecto a nuestras propias conclusiones. La técnica empleada en el presente estudio ha demostrado ser no invasiva, lo cual, añadido al hecho de que en nuestros experimentos no se restringió el libre movimiento de los blastocistos, nos permite afirmar que nuestro abordaje produce resultados de gran fiabilidad.

Los experimentos realizados en este trabajo dejan claro que en los estadios de dos y cuatro células, los blastómeros todavía no están comprometidos para dar lugar a un linaje en concreto en el blastocisto. Esto desplaza esta decisión a momentos posteriores del desarrollo, probablemente en torno a la compactación y la polarización, que ocurren en el estadio de ocho células. Es posible que estos fenómenos estén dirigiendo la segregación de los dos primeros linajes, al generar dos tipos celulares morfológicamente distinguibles. Este evento desencadena una reorganización de la estructura celular interna de los blastómeros, que produce por primera vez diferencias entre células a nivel molecular. Seguramente sean estas diferencias moleculares dentro de cada célula las que de alguna manera repercuten sobre los niveles y la localización de *Cdx2*, y en definitiva sobre su patrón de expresión. Así, *Cdx2* se acabaría por restringir a las células más externas y contribuiría al mantenimiento y la especificación definitiva del trofoectodermo.

Con nuestro trabajo aportamos una nueva aproximación experimental que ha demostrado ser totalmente no invasiva y que es una novedad en el campo. Con esta técnica podemos marcar

blastómeros en cualquier estadio de preimplantación y conocer la contribución de su descendencia. Sin embargo, tras los resultados obtenidos queda abierta la pregunta de cuál es el momento, dentro de las divisiones siguientes, en el que los blastómeros se comprometen para dar lugar específicamente a uno de los dos linajes.

En el futuro intentaremos contestar a esta pregunta continuando con el uso de este marcaje, pero en estadios posteriores. Esto quiere decir que será necesario llevar a cabo el marcaje de una célula o grupo de células en el estadio de ocho células, 16 células, y así sucesivamente. En los próximos experimentos, se incluirá una modificación en la técnica que creemos que mejorará su rendimiento. Así, en lugar del gen *lacZ*, usaremos un gen fluorescente como marcador, ya que esto nos permitirá visualizar las células que han quedado marcadas, poco después del tratamiento. Así, tendremos un conocimiento más directo del fenómeno de marcaje y no será necesario el abordar los resultados de los experimentos de forma indirecta, en retrospectiva, como hemos hecho hasta ahora con el marcador *lacZ*.

La puesta a punto de esta técnica deja una puerta abierta también a futuras aplicaciones en el conocimiento del origen del resto de los linajes que componen el blastocisto. De una forma parecida, podremos utilizar este sistema de trazado para conocer el origen y la especificación del endodermo primitivo desde las células de la masa celular interna (figura 3B, C). Hasta ahora sabemos que entre las células de la masa celular interna aparecen algunas que comienzan a expresar marcadores que las diferencian del resto, como es el caso de *Gata6*, pero anteriormente también *lefty* (Takaoka et al., 2006). Si con esta técnica somos capaces de marcar células dentro de la masa celular interna, podremos ahondar en los fenómenos morfogénicos por los que estas células deciden en un momento determinado migrar hacia la superficie de contacto del blastocelo y formar la monocapa del endodermo primitivo.

## 7.2 ¿De dónde viene el blastocisto del ratón?

Es difícil atribuir un origen evolutivo a una estructura tan sumamente novedosa como es el blastocisto del ratón. El estudio del blastodisco del embrión del pollo que hemos llevado a cabo en este trabajo nos hace pensar que estructuralmente recuerda al blastocisto del ratón. De la misma manera, *Cdx2* se expresa marcando la parte más externa del embrión, que dará lugar a la mayoría de los tejidos extraembrionarios. Sin embargo, no parece tratarse de estructuras equivalentes en términos evolutivos. El área opaca no sería equivalente al trofoectodermo, que por el contrario aparece como una novedad asociado al linaje de los mamíferos. El área opaca tendría un origen diferente que podría tener más que ver con el *bauplan* general de los vertebrados. Según esto, el plan corporal básico incluiría un eje anteroposterior en el que se ubican más anteriormente la cabeza y en niveles más caudales las extremidades anteriores y posteriores, para concluir con la región posterior en la que se sitúa la cola. Podría ser que esta región posterior venga especificada por la presencia de *Cdx2*, como también ocurre en los condictios (Coolen et al., 2007). A lo largo de la evolución, se produciría una expansión de

esta zona posterior para acabar englobando al embrión, tal y como observamos en el pollo. Por eso, se podría decir que *Cdx2* serviría para marcar el carácter posterior, que en definitiva no sería más que una manifestación inicial del carácter extraembrionario.

Si este carácter posterior-extraembrionario del área opaca fuera algo tan conservado evolutivamente, es probable que los elementos proximales que se localizaron en torno a *Cdx2* tanto en el ratón como en el pollo dirigieran expresión en esta estructura. No obstante, serán necesarios futuros experimentos en los que se electroporen estas regiones en el embrión del pollo para probar su capacidad reguladora y así ahondar en esta hipótesis.

El blastocisto, tal como lo conocemos no aparece en monotremas, aunque en los marsupiales podemos encontrar ya un blastocisto, con una organización que tiene ciertos elementos en común. El embrión temprano de estos animales sufre varios ciclos de divisiones, que a diferencia del ratón se ven limitadas en el espacio por la presencia de una yema en uno de sus polos (Selwood et al., 1997). En este sentido, es llamativo que la región que hemos identificado de *Cdx2* de ratón que dirige expresión en el trofoectodermo no está conservada en la zarigüeya. Será necesario estudiar la expresión génica en embriones en estadios muy tempranos de esta especie para averiguar si el papel de *Cdx2* en la especificación temprana de linajes es común a todos los mamíferos o bien es un carácter exclusivo de euterios.

A lo largo de la evolución, los mamíferos se han visto empujados a desarrollar todo un sistema de tejidos externos de soporte porque el huevo que generan no tiene yema como en otros vertebrados. Por el contrario, se han de desarrollar en el útero y han de nutrirse desde el torrente sanguíneo de la madre. A su vez, formar un sistema de estructuras tan sofisticado requiere un tiempo de desarrollo más prolongado y esto conlleva una pluripotencialidad más prolongada y una especificación de los ejes del embrión más tardía. Con la co-opción de *Cdx2* para la generación del trofoectodermo, la masa celular interna permanecerá durante este tiempo indeterminada, lo que implica también el reclutamiento de los genes que se encargan de mantener su pluripotencialidad. Por todas estas razones, a la hora de estudiar los linajes que componen el blastocisto del ratón, debemos ser conscientes de que nos hayamos ante una novedad evolutiva, un nuevo elemento que la evolución ha inventado para solucionar las particularidades del desarrollo intrauterino de los mamíferos.

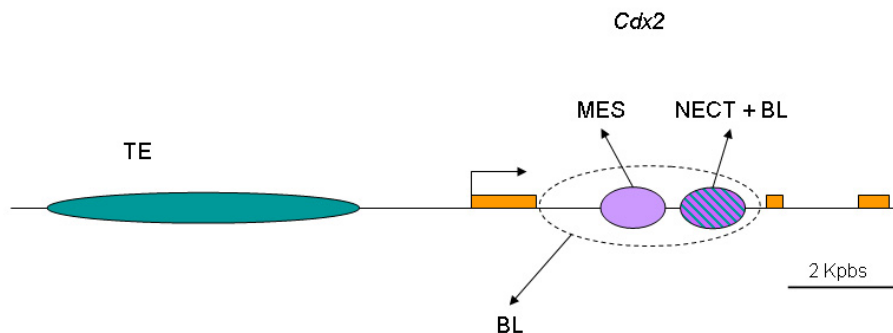
Es necesario, por tanto, averiguar cómo se ha reclutado toda una red de genes que se encargara por primera vez del control genético del desarrollo del blastocisto de los mamíferos euterios. Para explicarnos la presencia de *Cdx2* en el trofoectodermo habría que recurrir a la co-opción de este gen, que ya estaba presente, para desempeñar una nueva función. Pero ¿cómo puede *Cdx2* llevar a cabo una función tan diferente de la que tenía hasta este momento? La respuesta parece estar en los cambios que ha sufrido su sistema de regulación.

En este trabajo describimos la presencia de elementos reguladores de la expresión de *Cdx2*, entre los que destaca un *enhancer* distal conservado sólo en mamíferos euterios, que parece ser específico del trofoectodermo. Así, este elemento podría ser parte del sistema que ha aparecido recientemente para encargarse del desarrollo del blastocisto.

Nuestros resultados acerca de las regiones que regulan la expresión de *Cdx2* están en consonancia con lo publicado hasta ahora. Con anterioridad a este trabajo se publicó un estudio (Wang y Shashikant, 2007) que si bien se centra en estadios posteriores del desarrollo del ratón, también hace referencia al periodo de preimplantación. En este trabajo se describe la capacidad de dirigir expresión génica de una región de 11,4 Kpbs que engloba la región codificante más las zonas inmediatamente adyacentes. Este fragmento reproduce prácticamente todo el patrón de expresión de *Cdx2* a excepción del ectodermo extraembrionario. A continuación, dividieron esta región en fragmentos menores para examinar su capacidad reguladora, algunas de las cuales solapan con las que hemos probado experimentalmente en el presente trabajo (Fig. 30)

De esta forma, corroboran la capacidad de la región localizada en el primer intrón de este gen de dirigir su expresión en el blastocisto, como se cumple también para nuestra construcción número 3 (Fig. 26 A, E-G). No obstante, el trabajo de Wang y colaboradores afirma que esta región sólo dirige expresión de *Cdx2* en la masa celular interna, mientras que nuestros resultados muestran como el gen marcador *lacZ* se expresa en todo el blastocisto.

Por tanto, parece que la presencia del elemento regulador distal en la región 5' que describimos por primera vez en este trabajo es clave para entender los cambios en la función de *Cdx2* que le llevan a participar en la especificación del trofoectodermo. A la vez, no sorprende que este elemento sólo se conserve entre los mamíferos y no esté conservado en otros vertebrados como el pollo, que como hemos visto no posee un linaje como el trofoectodermo.



**Figura 30:** Resumen de los elementos reguladores identificados para *Cdx2*. En nuestro estudio hemos localizado un elemento distal en la región 5' que dirige expresión en el trofoectodermo, además de un elemento en la región 3' del intrón (bandas moradas y verdes) que dirige expresión en todo el blastocisto. El estudio de Wang y colaboradores (Wang and Shashikant, 2007) da cuenta de este mismo elemento, que además dirige expresión en estadios de postimplantación en el neuroectodermo. Además, el citado trabajo ha descrito la capacidad del elemento localizado en la porción más 5' del primer intrón de dirigir expresión en el mesodermo en estadios de postimplantación, así como de la región que engloba todo el primer intrón de *Cdx2* para dirigir expresión en el todo el blastocisto. TE: Trofoectodermo; BL: Blastocisto; MES: Mesodermo; NECT: Neuroectodermo.

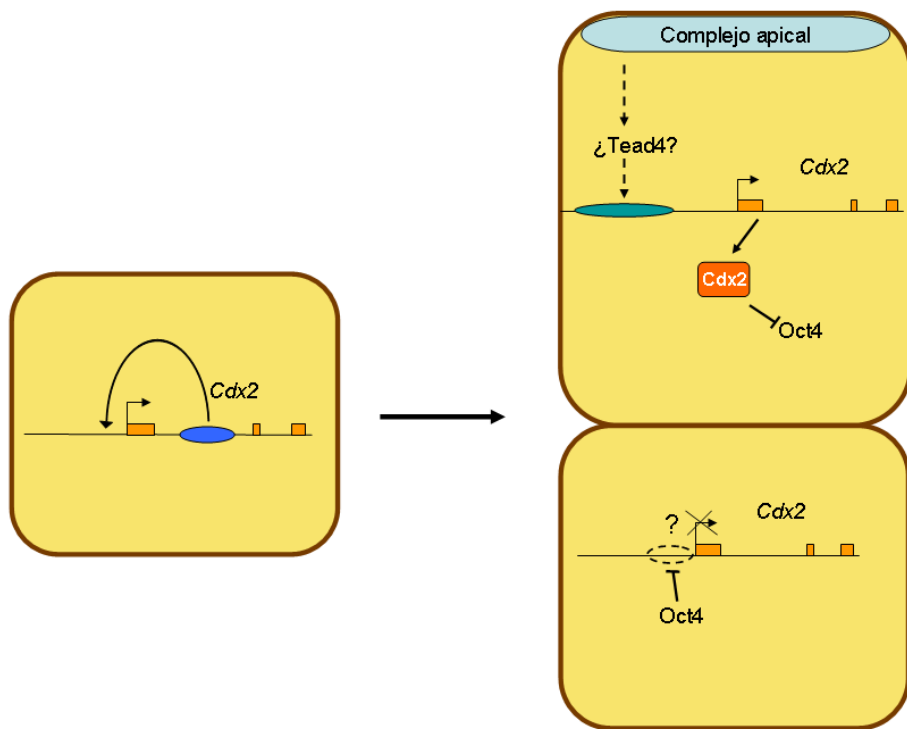
### 7.3 Linajes, morfología y redes génicas: ¿huevo o gallina?

Aunque *Cdx2* es un elemento clave en la especificación del trofoectodermo, no parece ser la causa última que inicia este evento. Sabemos que el ratón mutante nulo para *Cdx2* forma un trofoectodermo incipiente, que si bien no llega a expresar los marcadores que lo caracterizan, al menos sufre una diferenciación morfológica inequívoca que lo convierte en un epitelio (Strumpf et al., 2005). Además, células que no expresan *Cdx2* son capaces de contribuir al trofoectodermo en quimeras (Ralston y Rossant, 2008). De la misma manera, tampoco parece que *Nanog* sea imprescindible para mantener la pluripotencia de las células del epiblasto, ya que células ES mutantes para este gen pueden mantenerse y dar lugar a prácticamente todos los linajes del embrión (Chambers et al., 2007). Estos resultados podrían interpretarse como que nos hallamos ante un conjunto de factores, que si bien no inician el proceso mismo de establecimiento de los linajes del blastocisto, son importantes en su mantenimiento.

Antes de que *Cdx2* se restrinja a las células externas en el blastocisto, se expresa en todos los blastómeros de la mórula y el blastocisto temprano, comenzando en el estadio de ocho células. La presencia de *Cdx2* en los momentos iniciales no parece dirigir el proceso de diferenciación del trofoectodermo, en tanto en cuanto sus niveles no son constantes, sino fluctuantes y no parece restringirse a los blastómeros externos hasta que el trofoectodermo se ha diferenciado morfológicamente (Dietrich y Hiiragi, 2008). Podría darse inicialmente una primera oleada de expresión general de *Cdx2* a través de un bucle de autorregulación activado por un elemento ubicado en uno de los intrones de *Cdx2* (Fig. 31, izquierda), como sucede en otros miembros de su familia (Gaunt et al., 2005), y sólo posteriormente *Cdx2* se restringiría al trofoectodermo al formarse el blastocisto. El hecho de detectar expresión dirigida por elementos reguladores de *Cdx2* también en la masa celular interna en este estadio puede deberse a que el mensajero de *lacZ* y/o su producto,  $\beta$ -galactosidasa, perduren desde etapas anteriores, o bien a que estamos empleando regiones reguladoras fuera de su contexto genómico, lo que altera su regulación temporal.

Por tanto, se podría decir desde este punto de vista que son los cambios morfológicos que tienen lugar a partir de la compactación y la polarización los que inician y dirigen la diferenciación de los dos primeros linajes, al menos en su etapa inicial, y que la restricción de *Cdx2* sigue a estos cambios. Como se mencionó, estos eventos suponen una redistribución de un buen número de factores que a partir de este momento se localizarán de forma diferencial en las regiones basolateral y apical de los blastómeros externos. Esto quiere decir que los cambios en la morfología son en último término cambios también a nivel molecular. Estos cambios arrancan el proceso de diferenciación del trofoectodermo de alguna manera que aún no conocemos. Pero lo que parece claro es que ha de haber una conexión entre estas diferencias moleculares y la restricción última de *Cdx2*.

Probablemente *Cdx2* estaría recibiendo información para modificar su patrón de expresión a través de otros factores que a su vez se unen a sus secuencias reguladoras. Esto explicaría la existencia de elementos reguladores que dirigen la expresión de *Cdx2* en todo el blastocisto, y de elementos como el que en este trabajo se describe que lo restringen al trofoectodermo. Consecuentemente, esta restricción no sería sólo espacial, sino también temporal. Probablemente los diferentes elementos reguladores se activen también en momentos diferentes para orquestar los cambios en la expresión de *Cdx2* desde la mórula temprana hasta que alcanza su ubicación definitiva en el trofoectodermo. Sin embargo, se requieren estudios en lo que se tenga en cuenta el aspecto temporal de la regulación ejercida por estos elementos para corroborar esta hipótesis.



**Figura 31:** Modelo de la especificación del trofoectodermo y la masa celular interna. Los niveles iniciales de *Cdx2* se mantendrían como consecuencia de un bucle de autorregulación a través de un elemento situado en el primer intrón del gen (izquierda). Posteriormente, la expresión de *Cdx2* se vería incrementada por factores que se expresan de forma diferencial en las células asimétricas del exterior y desplazaría el equilibrio que mantenía con *Oct4* hasta ese momento. Así, se produciría la restricción de *Cdx2* a las células externas del trofoectodermo (derecha). En la parte superior derecha se representa en azul el complejo de proteínas que se distribuyen asimétricamente en la parte apical de las células polares.

Tras este estudio, se hace necesario conocer los factores que actúan antes de *Cdx2*, una vez que los blastómeros han adquirido un perfil molecular diferente en función de su posición. Uno de los principales candidatos a transmitir esta “señal asimétrica” (Yamanaka et al., 2006) a *Cdx2* podría ser el gen *Tead4*. Este factor se expresa homogéneamente en todo el blastocisto (Nishioka et al., 2008), y su ausencia es letal antes de la implantación (Nishioka et al., 2008; Yagi et al., 2007). El mutante de *Tead4* no forma un blastocisto y todos los marcadores característicos del trofoectodermo están ausentes, incluido *Cdx2*. Por el contrario, todas las células del embrión expresan niveles altos de *Oct4*. Por tanto, *Tead4* podría tener un papel específico en el trofoectodermo y actuar directa o indirectamente por encima de *Cdx2* para transmitir la información que le permite saber que se encuentra en una célula polarizada (Fig. 31, derecha).

Otro posible nivel de regulación vendría dado por los diferentes factores de transcripción con los que *Cdx2* puede actuar conjuntamente. Es sabido que *Cdx2* y *Oct4* forman un dímero que inhibe la expresión tanto de *Cdx2* como de *Oct4* (Niwa et al., 2005). Este mecanismo podría mantener los niveles de *Cdx2* y *Oct4* equilibrados hasta que pequeñas diferencias en los niveles de expresión de uno de los dos factores desplazan el equilibrio a favor de uno de ellos. Parece tentador pensar que serían cambios en la regulación que restringen *Cdx2* e incrementan sus niveles de expresión en el trofoectodermo como los mencionados más arriba los que contribuirían a alterar este equilibrio.

Queda claro por tanto que existe una relación indisoluble entre la adquisición de una morfología determinada por parte de las células que componen la mórula y la posterior adquisición de un perfil de expresión característico. Esto nos devuelve a la pregunta de en qué momento se deciden los linajes en el blastocisto. Habría que plantearse por tanto si debemos hablar de especificación del trofoectodermo y la masa celular interna ya desde el momento en el que se forma un protoepitelio en el exterior del embrión y células sin polarizar en el interior, aún sin la expresión de los factores de transcripción que los definen, o si por el contrario no podemos hablar de linajes distintos hasta que estas células adquieren un perfil determinado de expresión de factores de transcripción como *Cdx2*, *eomes*, *Oct4* o *Nanog*. Queda mucho por saber aún acerca de la regulación de la expresión de estos genes, así como de las interacciones entre ellos que de forma orquestada contribuyen a mantener la pluripotencia y especificar los linajes que componen el blastocisto.





## 8 Conclusiones



1. La técnica empleada para el trazado de linajes en los embriones tempranos de ratón mediante la administración de tamoxifeno no es en absoluto invasiva. Por tanto, podemos afirmar que no estamos interfiriendo en las etapas del desarrollo que hemos estudiado.
2. Los descendientes de los blastómeros del embrión en dos y cuatro células se distribuyen al azar en el blastocisto y en estadios posteriores del desarrollo del ratón.
3. De acuerdo con estos resultados, no existiría una predeterminación desde estos momentos del desarrollo por la que las células ya tengan un destino asignado.
4. El patrón de expresión de *Cdx2* en el embrión temprano del pollo sigue una disposición espacial que se asemeja al ya descrito para el blastocisto del ratón. Sin embargo, no parece que ambas estructuras sean equiparables desde el punto de vista evolutivo. Además, el control de la expresión de *Cdx2* en el trofoectodermo y el área opaca pudiera deberse a mecanismos diferentes.
5. Mediante el estudio de la región genómica del gen *Cdx2* de ratón, hemos localizado elementos que dirigen su expresión en el blastocisto. Entre ellos, hemos encontrado tanto elementos que dirigen expresión en todo el blastocisto como un elemento distal localizado en la región *upstream* de *Cdx2* que parece dirigir fuertemente su expresión de forma restringida al trofoectodermo.



## 9 Bibliografía



- Alarcon, V. B., and Marikawa, Y. (2005). Unbiased contribution of the first two blastomeres to mouse blastocyst development. *Mol Reprod Dev* 72, 354-361.
- Ariza-McNaughton, L., and Krumlauf, R. (2002). Non-radioactive in situ hybridization: simplified procedures for use in whole-mounts of mouse and chick embryos. *Int Rev Neurobiol* 47, 239-250.
- Arques, C. G., Doohan, R., Sharpe, J., and Torres, M. (2007). Cell tracing reveals a dorsoventral lineage restriction plane in the mouse limb bud mesenchyme. *Development* 134, 3713-3722.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.
- Bates, W. R., and Jeffery, W. R. (1988). Polarization of ooplasmic segregation and dorsal-ventral axis determination in ascidian embryos. *Dev Biol* 130, 98-107.
- Beck, F., Erler, T., Russell, A., and James, R. (1995). Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn* 204, 219-227.
- Beddington, R. S., and Robertson, E. J. (1999). Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96, 195-209.
- Blumberg, B., Wright, C. V., De Robertis, E. M., and Cho, K. W. (1991). Organizer-specific homeobox genes in *Xenopus laevis* embryos. *Science* 253, 194-196.
- Boardman, P. E., Sanz-Ezquerro, J., Overton, I. M., Burt, D. W., Bosch, E., Fong, W. T., Tickle, C., Brown, W. R., Wilson, S. A., and Hubbard, S. J. (2002). A comprehensive collection of chicken cDNAs. *Curr Biol* 12, 1965-1969.
- Bretscher, A., Chambers, D., Nguyen, R., and Reczek, D. (2000). ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 113-143.
- Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Chambon, P., and Metzger, D. (1997). Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14559-14563.
- Brooke, N. M., Garcia-Fernandez, J., and Holland, P. W. (1998). The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* 392, 920-922.
- Bullinger, L., Dohner, K., Kranz, R., Stirner, C., Frohling, S., Scholl, C., Kim, Y. H., Schlenk, R. F., Tibshirani, R., Dohner, H., and Pollack, J. R. (2008). A FLT3 gene-expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML. *Blood*.
- Callebaut, M. (2005). Origin, fate, and function of the components of the avian germ disc region and early blastoderm: role of ooplasmic determinants. *Dev Dyn* 233, 1194-1216.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450, 1230-1234.
- Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V. E., Kontgen, F., and Beck, F. (1997). Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386, 84-87.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell* 10, 615-624.



- Chroscicka, A., Komorowski, S., and Maleszewski, M. (2004). Both blastomeres of the mouse 2-cell embryo contribute to the embryonic portion of the blastocyst. *Mol Reprod Dev* 68, 308-312.
- Ciruna, B. G., and Rossant, J. (1999). Expression of the T-box gene *Eomesodermin* during early mouse development. *Mech Dev* 81, 199-203.
- Collignon, J., Sockanathan, S., Hacker, A., Cohen-Tannoudji, M., Norris, D., Rastan, S., Stevanovic, M., Goodfellow, P. N., and Lovell-Badge, R. (1996). A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 122, 509-520.
- Coolen, M., Sauka-Spengler, T., Nicolle, D., Le-Mentec, C., Lallemand, Y., Da Silva, C., Plouhinec, J. L., Robert, B., Wincker, P., Shi, D. L., and Mazan, S. (2007). Evolution of axis specification mechanisms in jawed vertebrates: insights from a chondrichthyan. *PLoS ONE* 2, e374.
- Coucouvanis, E., and Martin, G. R. (1995). Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 83, 279-287.
- Cross, J. C. (2006). Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev* 18, 71-76.
- Deb, K., Sivaguru, M., Yong, H. Y., and Roberts, R. M. (2006). *Cdx2* gene expression and trophoctoderm lineage specification in mouse embryos. *Science* 311, 992-996.
- Dietrich, J. E., and Hiiragi, T. (2008). Stochastic Processes during Mouse Blastocyst Patterning. *Cells Tissues Organs*.
- Ducibella, T., and Anderson, E. (1975). Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev Biol* 47, 45-58.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 752-757.
- Fleming, T. P. (1987). A quantitative analysis of cell allocation to trophoctoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 119, 520-531.
- Fleming, T. P., Cannon, P. M., and Pickering, S. J. (1986a). The cytoskeleton, endocytosis and cell polarity in the mouse preimplantation embryo. *Dev Biol* 113, 406-419.
- Fleming, T. P., and Johnson, M. H. (1988). From egg to epithelium. *Annu Rev Cell Biol* 4, 459-485.
- Fleming, T. P., Papenbrock, T., Fesenko, I., Hausen, P., and Sheth, B. (2000). Assembly of tight junctions during early vertebrate development. *Semin Cell Dev Biol* 11, 291-299.
- Fleming, T. P., and Pickering, S. J. (1985). Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during mouse preimplantation development. *J Embryol Exp Morphol* 89, 175-208.
- Fleming, T. P., Pickering, S. J., Qasim, F., and Maro, B. (1986b). The generation of cell surface polarity in mouse 8-cell blastomeres: the role of cortical microfilaments analysed using cytochalasin D. *J Embryol Exp Morphol* 95, 169-191.
- Frazer, K. A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E. M., and Dubchak, I. (2004). VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 32, W273-279.
- Fujimori, T., Kurotaki, Y., Miyazaki, J., and Nabeshima, Y. (2003). Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos. *Development* 130, 5113-5122.
- Gamer, L. W., and Wright, C. V. (1993). Murine *Cdx-4* bears striking similarities to the *Drosophila* caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech Dev* 43, 71-81.
- Garcia-Fernandez, J. (2005). The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat Rev Genet* 6, 881-892.
- Gardner, R. L. (1997). The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse. *Development* 124, 289-301.

- Gardner, R. L. (2001). Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development. *Development* 128, 839-847.
- Gaunt, S. J., Drage, D., and Trubshaw, R. C. (2005). *cdx4/lacZ* and *cdx2/lacZ* protein gradients formed by decay during gastrulation in the mouse. *Int J Dev Biol* 49, 901-908.
- Gerhart, J., Ubbels, G., Black, S., Hara, K., and Kirschner, M. (1981). A reinvestigation of the role of the grey crescent in axis formation in *xenopus laevis*. *Nature* 292, 511-516.
- Gilbert, S. F. (2003). *Developmental biology*, 7th edn (Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates).
- Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4, 111-120.
- Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 195, 231-272.
- Hancock, S. N., Agulnik, S. I., Silver, L. M., and Papaioannou, V. E. (1999). Mapping and expression analysis of the mouse ortholog of *Xenopus Eomesodermin*. *Mech Dev* 81, 205-208.
- Hiiragi, T., Alarcon, V. B., Fujimori, T., Louvet-Vallee, S., Maleszewski, M., Marikawa, Y., Maro, B., and Solter, D. (2006). Where do we stand now? Mouse early embryo patterning meeting in Freiburg, Germany (2005). *Int J Dev Biol* 50, 581-586; discussion 586-587.
- Hillman, B., and Charney, E. (1972). A neighborhood health center: what the patients know and think of its operation. *Med Care* 10, 336-344.
- Hogan, B., and Tilly, R. (1978). In vitro development of inner cell masses isolated immunosurgically from mouse blastocysts. I. Inner cell masses from 3.5-day p.c. blastocysts incubated for 24 h before immunosurgery. *J Embryol Exp Morphol* 45, 93-105.
- Houliston, E., Pickering, S. J., and Maro, B. (1987). Redistribution of microtubules and pericentriolar material during the development of polarity in mouse blastomeres. *J Cell Biol* 104, 1299-1308.
- Hubbard, T. J., Aken, B. L., Beal, K., Ballester, B., Caccamo, M., Chen, Y., Clarke, L., Coates, G., Cunningham, F., Cutts, T., *et al.* (2007). Ensembl 2007. *Nucleic Acids Res* 35, D610-617.
- Imai, T., Jiang, M., Chambon, P., and Metzger, D. (2001). Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 224-228.
- Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J. M., Xiao, J. H., Chambon, P., and Metzger, D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27, 4324-4327.
- Johnson, M. H., and Maro, B. (1984). The distribution of cytoplasmic actin in mouse 8-cell blastomeres. *J Embryol Exp Morphol* 82, 97-117.
- Johnson, M. H., and McConnell, J. M. (2004). Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 15, 583-597.
- Johnson, M. H., and Ziomek, C. A. (1982). Cell subpopulations in the late morula and early blastocyst of the mouse. *Dev Biol* 91, 431-439.
- Joyner, A. L., and Zervas, M. (2006). Genetic inducible fate mapping in mouse: establishing genetic lineages and defining genetic neuroanatomy in the nervous system. *Dev Dyn* 235, 2376-2385.
- Kim, T. H., Abdullaev, Z. K., Smith, A. D., Ching, K. A., Loukinov, D. I., Green, R. D., Zhang, M. Q., Lobanenko, V. V., and Ren, B. (2007). Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* 128, 1231-1245.

- Kimmel, R. A., Turnbull, D. H., Blanquet, V., Wurst, W., Loomis, C. A., and Joyner, A. L. (2000). Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev* 14, 1377-1389.
- Kurotaki, Y., Hatta, K., Nakao, K., Nabeshima, Y., and Fujimori, T. (2007). Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science* 316, 719-723.
- Legue, E., and Nicolas, J. F. (2005). Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors. *Development* 132, 4143-4154.
- Lenhard, B., Sandelin, A., Mendoza, L., Engstrom, P., Jareborg, N., and Wasserman, W. W. (2003). Identification of conserved regulatory elements by comparative genome analysis. *J Biol* 2, 13.
- Louvet-Vallee, S., Vinot, S., and Maro, B. (2005). Mitotic spindles and cleavage planes are oriented randomly in the two-cell mouse embryo. *Curr Biol* 15, 464-469.
- Maro, B., Johnson, M. H., Pickering, S. J., and Louvard, D. (1985). Changes in the distribution of membranous organelles during mouse early development. *J Embryol Exp Morphol* 90, 287-309.
- Marom, K., Shapira, E., and Fainsod, A. (1997). The chicken caudal genes establish an anterior-posterior gradient by partially overlapping temporal and spatial patterns of expression. *Mech Dev* 64, 41-52.
- McGinnis, W., and Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.
- Meyer, B. I., and Gruss, P. (1993). Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development* 117, 191-203.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642.
- Morales, A. V., de la Rosa, E. J., and de Pablo, F. (1996). Expression of the cCdx-B homeobox gene in chick embryo suggests its participation in rostrocaudal axial patterning. *Dev Dyn* 206, 343-353.
- Moreno, E., and Morata, G. (1999). Caudal is the Hox gene that specifies the most posterior *Drosophila* segment. *Nature* 400, 873-877.
- Mosammamaparast, N., Jackson, K. R., Guo, Y., Brame, C. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Pemberton, L. F. (2001). Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J Cell Biol* 153, 251-262.
- Motosugi, N., Bauer, T., Polanski, Z., Solter, D., and Hiiragi, T. (2005). Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes Dev* 19, 1081-1092.
- Nagy, A., Gertszensten, M., Vintersten, K., and Behringer, R. (2003). Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual, 3rd edn (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.
- Nieto, M. A., Patel, K., and Wilkinson, D. G. (1996). In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Methods Cell Biol* 51, 219-235.
- Nishioka, N., Yamamoto, S., Kiyonari, H., Sato, H., Sawada, A., Ota, M., Nakao, K., and Sasaki, H. (2008). Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 125, 270-283.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-376.

- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123, 917-929.
- Northrop, J. L., and Kimelman, D. (1994). Dorsal-ventral differences in Xcad-3 expression in response to FGF-mediated induction in *Xenopus*. *Dev Biol* 161, 490-503.
- O'Farrell, P. H., Stumpff, J., and Su, T. T. (2004). Embryonic cleavage cycles: how is a mouse like a fly? *Curr Biol* 14, R35-45.
- Ohlsson, H., Karlsson, K., and Edlund, T. (1993). IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J* 12, 4251-4259.
- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H., and Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 280, 5307-5317.
- Ovcharenko, I., Loots, G. G., Giardine, B. M., Hou, M., Ma, J., Hardison, R. C., Stubbs, L., and Miller, W. (2005). Mulan: multiple-sequence local alignment and visualization for studying function and evolution. *Genome Res* 15, 184-194.
- Papaioannou, V. E. (1982). Lineage analysis of inner cell mass and trophectoderm using microsurgically reconstituted mouse blastocysts. *J Embryol Exp Morphol* 68, 199-209.
- Pauken, C. M., and Capco, D. G. (1999). Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos: roles for PKC and beta-catenin. *Mol Reprod Dev* 54, 135-144.
- Pauken, C. M., and Capco, D. G. (2000). The expression and stage-specific localization of protein kinase C isoforms during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 223, 411-421.
- Pedersen, R. A., Wu, K., and Balakier, H. (1986). Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Dev Biol* 117, 581-595.
- Piotrowska, K., and Zernicka-Goetz, M. (2001). Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature* 409, 517-521.
- Piotrowska-Nitsche, K., and Zernicka-Goetz, M. (2005). Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mech Dev* 122, 487-500.
- Plusa, B., Frankenberg, S., Chalmers, A., Hadjantonakis, A. K., Moore, C. A., Papaioannou, V. E., Glover, D. M., and Zernicka-Goetz, M. (2005). Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Sci* 118, 505-515.
- Pratt, H. P., Ziomek, C. A., Reeve, W. J., and Johnson, M. H. (1982). Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *J Embryol Exp Morphol* 70, 113-132.
- Ralston, A., and Rossant, J. (2008). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol* 313, 614-629.
- Reeve, W. J. (1981). Cytoplasmic polarity develops at compaction in rat and mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 62, 351-367.
- Reeve, W. J., and Ziomek, C. A. (1981). Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: evidence for surface polarization at compaction. *J Embryol Exp Morphol* 62, 339-350.
- Riethmacher, D., Brinkmann, V., and Birchmeier, C. (1995). A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 855-859.
- Roberts, R. M., Sivaguru, M., and Yong, H. Y. (2007). Retraction. *Science* 317, 450.
- Robinson, S. P., Langan-Fahey, S. M., Johnson, D. A., and Jordan, V. C. (1991). Metabolites, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of tamoxifen in rats and mice compared to the breast cancer patient. *Drug Metab Dispos* 19, 36-43.

- Rodriguez, T. A., Srinivas, S., Clements, M. P., Smith, J. C., and Beddington, R. S. (2005). Induction and migration of the anterior visceral endoderm is regulated by the extra-embryonic ectoderm. *Development* **132**, 2513-2520.
- Rossant, J. (1976). Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol* **36**, 283-290.
- Rossant, J. (2004). Lineage development and polar asymmetries in the peri-implantation mouse blastocyst. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 573-581.
- Rossant, J., Chazaud, C., and Yamanaka, Y. (2003). Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 1341-1348; discussion 1349.
- Rossant, J., and Tam, P. P. (2004). Emerging asymmetry and embryonic patterning in early mouse development. *Dev Cell* **7**, 155-164.
- Rothchild, I. (2003). The yolkless egg and the evolution of eutherian viviparity. *Biol Reprod* **68**, 337-357.
- Russ, A. P., Wattler, S., Colledge, W. H., Aparicio, S. A., Carlton, M. B., Pearce, J. J., Barton, S. C., Surani, M. A., Ryan, K., Nehls, M. C., *et al.* (2000). Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* **404**, 95-99.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5166-5170.
- Sawada, T., and Schatten, G. (1989). Effects of cytoskeletal inhibitors on ooplasmic segregation and microtubule organization during fertilization and early development in the ascidian *Molgula occidentalis*. *Dev Biol* **132**, 331-342.
- Scholer, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N., and Gruss, P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *Embo J* **8**, 2543-2550.
- Scholer, H. R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* **344**, 435-439.
- Schultz, R. M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* **8**, 323-331.
- Schwartz, S., Zhang, Z., Frazer, K. A., Smit, A., Riemer, C., Bouck, J., Gibbs, R., Hardison, R., and Miller, W. (2000). PipMaker--a web server for aligning two genomic DNA sequences. *Genome Res* **10**, 577-586.
- Selwood, L., and Johnson, M. H. (2006). Trophoblast and hypoblast in the monotreme, marsupial and eutherian mammal: evolution and origins. *Bioessays* **28**, 128-145.
- Selwood, L., Robinson, E. S., Pedersen, R. A., and Vandeberg, J. L. (1997). Development in vitro of Marsupials: a comparative review of species and a timetable of cleavage and early blastocyst stages of development in *Monodelphis domestica*. *Int J Dev Biol* **41**, 397-410.
- Siegel, N., Hoegg, S., Salzburger, W., Braasch, I., and Meyer, A. (2007). Comparative genomics of ParaHox clusters of teleost fishes: gene cluster breakup and the retention of gene sets following whole genome duplications. *BMC Genomics* **8**, 312.
- Slack, J. M., Holland, P. W., and Graham, C. F. (1993). The zootype and the phylotypic stage. *Nature* **361**, 490-492.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**, 70-71.
- Stern, C. D. (2005). The chick; a great model system becomes even greater. *Dev Cell* **8**, 9-17.
- Strumpf, D., Mao, C. A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., and Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* **132**, 2093-2102.

- Takaoka, K., Yamamoto, M., Shiratori, H., Meno, C., Rossant, J., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2006). The mouse embryo autonomously acquires anterior-posterior polarity at implantation. *Dev Cell* 10, 451-459.
- Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A. K., Nagy, A., and Rossant, J. (1998). Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282, 2072-2075.
- Tarkowski, A. K. (1959). Experiments on the development of isolated blastomers of mouse eggs. *Nature* 184, 1286-1287.
- Tarkowski, A. K. (1961). Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature* 190, 857-860.
- Tarkowski, A. K., and Wroblewska, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* 18, 155-180.
- Thomas, F. C., Sheth, B., Eckert, J. J., Bazzoni, G., Dejana, E., and Fleming, T. P. (2004). Contribution of JAM-1 to epithelial differentiation and tight-junction biogenesis in the mouse preimplantation embryo. *J Cell Sci* 117, 5599-5608.
- Torres, M., Stoykova, A., Huber, O., Chowdhury, K., Bonaldo, P., Mansouri, A., Butz, S., Kemler, R., and Gruss, P. (1997). An alpha-E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 901-906.
- Vestweber, D., Gossler, A., Boller, K., and Kemler, R. (1987). Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol* 124, 451-456.
- Wang, W. C., and Shashikant, C. S. (2007). Evidence for positive and negative regulation of the mouse *Cdx2* gene. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308, 308-321.
- Watson, A. J., and Barcroft, L. C. (2001). Regulation of blastocyst formation. *Front Biosci* 6, D708-730.
- Wishart, G., and Horrocks, A. J. (2000). Fertilization in birds. In *Fertilization in protozoa and metazoan animals*, J. J. Tarina, and A. Cano, eds. (Heidelberg, Springer-Verlag), pp. 193-222.
- Wolpert, L., Beddington, R. S., Jessell, T. M., Lawrence, P., Meyerowitz, E., and Smith, J. (2002). *Principles of development*, 2nd edn (Oxford, Oxford University Press).
- Yagi, R., Kohn, M. J., Karavanova, I., Kaneko, K. J., Vullhorst, D., DePamphilis, M. L., and Buonanno, A. (2007). Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 134, 3827-3836.
- Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, R. O., and Rossant, J. (2006). Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 235, 2301-2314.
- Yeom, Y. I., Fuhrmann, G., Ovitt, C. E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hubner, K., and Scholer, H. R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122, 881-894.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., and Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 9, 2635-2645.
- Zernicka-Goetz, M. (1998). Fertile offspring derived from mammalian eggs lacking either animal or vegetal poles. *Development* 125, 4803-4808.
- Zernicka-Goetz, M. (2006). The first cell-fate decisions in the mouse embryo: destiny is a matter of both chance and choice. *Curr Opin Genet Dev* 16, 406-412.
- Zhang, Z., and Gerstein, M. (2003). Of mice and men: phylogenetic footprinting aids the discovery of regulatory elements. *J Biol* 2, 11.
- Ziomek, C. A., and Johnson, M. H. (1982). The roles of phenotype and position in guiding the fate of 16-cell mouse blastomeres. *Dev Biol* 91, 440-447.
- Ziomek, C. A., Johnson, M. H., and Handyside, A. H. (1982). The developmental potential of mouse 16-cell blastomeres. *J Exp Zool* 221, 345-355.



Es complicado escribir los agradecimientos cuando sabes que el 95% de la gente que abre la tesis, sólo lee los agradecimientos. Pensé que tendría problemas cuando me viera frente a la pantalla en blanco para empezar la introducción o la discusión, pero realmente después de cinco años, ésta es la parte más difícil. Cuando llegué al laboratorio 1.5.2 del IIB (no voy a decir la fecha...) no había ni aparatos, ni reactivos, ni ordenadores, ni becarios. Ahora dejo este laboratorio en el que estamos nueve personas y que funciona a pleno rendimiento. Entre medias ha pasado un tiempo en el que ha habido que poner en marcha absolutamente todo. Algo que al principio puede llegar a ser muuuuuy lento, y que sólo ha llegado a ser lo que es gracias a las que ahora son mis compañeras.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Miguel Manzanares por su ayuda, su optimismo, su carácter tan sumamente positivo y constructivo, sus millones de ideas... Miguel es el jefe que te convence de que tus resultados son buenos cuando tú crees que no, es el mundo al revés. Con él he aprendido a tener una visión crítica y a no creermelo las cosas "porque sí". Muchas gracias a Miguel por creer en mí cuando me presenté en su despacho con el CV en la mano. Sé que vaya donde vaya, no voy a encontrar a nadie como él.

Muchas gracias a mis padres, que aunque les dedico mi trabajo, sólo puedo insistir una vez más en mi agradecimiento por su apoyo incondicional. Siempre. Muchas gracias a mis hermanos, que siempre me han animado desde la distancia, ahora que yo soy el único que no ha vuelto a casa.

Muchas gracias a Miguel Torres y a Carlos G. Arques, por formar parte de lo que ha acabado siendo la mitad de esta tesis. Por aportar las ideas iniciales, pero también la crítica constructiva durante todo el periodo de realización del trabajo en sí. Francamente, mi tesis es lo que es gracias a vosotros.

Muchas gracias a Susana Cañón, mi primera compañera de laboratorio. La que, junto a Miguel, me ha enseñado todo lo que sé. Con la que compartí los momentos más "iniciáticos" cuando no teníamos casi ni nevera. La persona a la que más debo porque sin ella yo no habría sabido hacer un triste experimento y ahora no estaría escribiendo esto. Además, teniendo en cuenta que Susana ha hecho una parte más que considerable de los experimentos que, a su vez, suponen la mitad de mi trabajo, se puede decir que esta tesis es mitad mía, mitad de Susana.

Muchas gracias a Eva Alonso, por llevar a cabo la parte técnicamente más difícil de esta tesis que yo presento; también por ser mi referee y darme un empujón en mi búsqueda de laboratorio. Pero mucho más importante que todo eso, y como todo el que ha trabajado con ella sabrá, por tener esa capacidad de sacrificio personal japonesa y de estar siempre dispuesta a trabajar por los demás sin perder la sonrisa, que le sitúan muy por encima del resto. Bendita Eva. Muchas gracias.

Muchas gracias a Bárbara Pernaute, mi amiga, mi compañera, mi apoyo. La persona con la que más horas de poyata he compartido en estos años. Una de las personas a las que más debo en lo profesional y en lo personal, y sin la que probablemente no habría llegado hasta aquí. Muchas gracias por la ilusión y por el apoyo. Muchas gracias por tu ayuda desinteresada e incondicional desde el primer momento. Muchas gracias por los ratos compartidos y por haber estado siempre ahí, en los momentos buenos, pero sobre todo también en los más difíciles. Muchas gracias por esforzarte en hacerme saber que he podido contar contigo siempre, pase lo que pase.

Muchísimas gracias a Teresa Rayón, uno de los últimos fichajes. Siguiendo en la línea sucesoria y heredera del proyecto. Muchas gracias por la ilusión y la motivación con la que has cogido al pobre cedequidós, que yo lo he dejado un poco manga por hombro. Por la paciencia y el buen humor, y por la condescendencia con mis despistes, que uno hace lo que puede, pero es lo que hay (Rayón, 2007). Muchas gracias por haber sido mi alegría en estos últimos meses de tesis, que algunas veces se me han hecho un poco cuesta arriba. Sin ti no habría sido lo mismo.

También quiero mostrar mi agradecimiento a mis compañeros que, si bien no han estado directamente vinculados a mi trabajo, siempre he podido contar con ellos. Muchas gracias a Bea F. Tresguerres, que también me ha tenido que aguantar más de una tarde sacando pollos y oírme decir improperios que habrían hecho sonrojar al mismísimo demonio, y que no voy a reproducir aquí porque estropearía los agradecimientos, con lo bien que me están quedando. Muchas gracias a Carlos Quijano, que estuvo con nosotros en los albores en el sotanillo del IIB.



Muchas gracias a Bea Román. Otra qué tal baila: más positiva no se puede. Y muchas gracias, pero sobre todo mucha suerte, a Cristina Arias, que llega en el mejor momento. Te deseo lo mejor de aquí en adelante. Ha sido un lujo y un privilegio, que no creo que mucha gente tenga, el poder compartir este tiempo con compañeras como vosotras.

Thanks so so very much to my beloved Tanja, who won't probably read this. Thanks for being so supportive, understanding and sweet to me since the very first day when I could barely say two sentences in a row in English and one of them was "I'm so jet lagged". Thanks very much indeed for treating me as a friend and making me feel at home, when I was as a matter of fact so faraway from home.

Muchas gracias, por supuesto, a todo el grupo de Miguel Torres, Nadia y Juanjo, y a Teresa, Sandra y Beatriz porque, cómo lo diría...cuando llegas a un sitio nuevo, si la gente es maja, pues mucho mejor.

Muchas gracias a los que fueron mis compañeros y amigos en el IIB, que han acabado a cada cuál más lejos. Especialmente muchas gracias a Laura Conejero, que tanto se ha acordado de mí mientras escribí esta tesis. Y muchas gracias a Itziar Gorospe, con la que tantas cosas he compartido en Madrid, pero también en Marruecos, Jordania, Turquía, Uzbekistán, Inglaterra, Portugal, Barcelona, Bilbao...espero que esto sea sólo el principio y que dentro de unos años no podamos ni acordarnos de la lista de sitios y conciertos. Muchas gracias por tu apoyo presente, pasado y espero que futuro.

Muchas gracias a Marta, por darme su apoyo y sus sms desde la otra punta del mundo cuando más falta me hacían, y por diez años de amistad.

Muchas gracias a Sandra, que ahora está también tan lejos de Madrid, pero que a pesar de ello se ha acordado de mí sin faltar ni un día en esta recta final y hasta me ha hecho mi primer regalo.

Muchas gracias a mi Jose, mi compañero de piso y mi amigo, en la salud y en la enfermedad, hasta que el postdoc nos separe. Aguantando los embates del destino, las subidas del IPC y los lípidos en la cocina. Eso sí que es para escribir una tesis, y no los elementos reguladores.

Muchas gracias a Julián, una persona con la que he disfrutado hablando de ciencia, de viajes, y de lo que se tercie. Julián sabe de lo que tú quieras.

Muchas gracias a Laura Riobos, con la que compartí los comienzos en este mundo del laboratorio, y a la que ahora echo tanto de menos por estar tan lejos.

Muchas gracias a Silvia, también lejos, desertora, pero que sabe lo que es la pipeta...

Muchas gracias a TODOS MIS AMIGOS, que nadie se sienta excluido. Sois los mejores. Como aprendí de pequeño con la bola de cristal: sólo no puedes; con amigos, sí.

Muchas gracias a toda la gente del IIB que ha hecho posible que este trabajo salga para adelante. Especialmente a aquellos que tuvieron que lidiar con nuestros ratones. Pero muy especialmente, claro, a Ana, la persona más trabajadora del mundo.

Muchas gracias a toda la gente del CNIC que también me ha ayudado un montón en estos meses que he pasado aquí. Muchas gracias a los chicos de informática, confocal, a las chicas del comedor que me ven delgado y me ponen más comida y a los vigilantes y a los de mantenimiento por encenderme las luces y dar la calefacción. Y perdón por las veces que salté la alarma.

Y mil perdones a quien me haya olvidado de mencionar, porque si me conoce bien, sabrá que a veces tengo un cierto déficit de atención y soy de mente más bien huidiza, pero yo os quiero a todos por igual.

Es un poco injusto porque al final la tesis sólo la puede firmar una persona, pero quien haya hecho una tesis sabrá que no la haces tú sólo. Se hace entre un montón de gente. Y sin vosotros, no habría tesis. Así que A TODOS, MUCHAS, MUCHAS, MUCHAS GRACIAS.

Miguel\*



